

Untersuchungen zur Regulation und Bedeutung der Serinprotease HTRA1 in Tumorzellen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät

Biologie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Kamilla Ripkens

aus Brüggen

Dezember 2014

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Mikrobiologie II der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Michael Ehrmann

2. Gutachter: Prof. Dr. Markus Kaiser

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Bernhard Horsthemke

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2015

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Michael Ehrmann für die Möglichkeit der Promotion im Rahmen des Graduiertenkollegs und für die Überlassung der selbstständigen Bearbeitung dieser Arbeit danken. Die fachliche Förderung, stetige Diskussionsbereitschaft und insbesondere menschliche Unterstützung haben sehr zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Prof. Dr. Dirk Schadendorf danke ich für die Überlassung der Melanom-Zelllinien und Antje Sucker für die Generierung der Melanom-Einzelzellklone und die Durchführung der Proliferationsanalysen.

Außerdem danke ich allen Kollegen der Arbeitsgruppe Ehrmann für eine sehr gute Zusammenarbeit im Labor und den zahlreichen Hilfestellungen, die mir immer wieder geboten wurden.

Weiterhin möchte ich mich bei Helmut und Adam für die technische Unterstützung und Hilfsbereitschaft im Laboralltag danken. Hierzu gehört ebenfalls die liebevolle Organisation von zahlreichen Treffen außerhalb des Laboralltags.

Simon und Kathi danke ich sehr für das Korrekturlesen dieser Arbeit und die stetige Bereitschaft zur Diskussion, welche oft zur Problemlösung und Verständnis der Ergebnisse beigetragen hat. Ganz besonders möchte ich mich für die freundschaftliche Unterstützung und herzliche Atmosphäre im Büro bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt außerdem Juliana Rey für das Durchführen von Arbeiten in der Zellkultur und dem Überlassen von experimentellen Daten.

Ganz besonders möchte ich meinem Mann Frank, meiner Familie, Ivonne und Rainer danken. Ihr habt mir während der ganzen Zeit menschlichen Halt gegeben und mir immer wieder neuen Mut zugesprochen.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung.....	III
Inhaltsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	XI
Abkürzungsverzeichnis	XIII
1 Einleitung.....	17
1.1 Die Familie der HtrA-Serinproteasen.....	17
1.1.1 Die humanen HTRAs	18
1.1.2 HTRA1	18
1.1.3 HTRA2	20
1.1.4 HTRA3	21
1.2 Regulation der Genexpression über epigenetische Mechanismen.....	22
1.2.1 DNA-Methylierung von CpG-Dinukleotiden	22
1.2.2 DNA-Methyl-bindende Proteine.....	24
1.2.3 Histonmodifikationen.....	25
1.2.4 Epigenetische Veränderungen in der Onkogenese	26
1.3 Die maligne Transformation.....	28
1.3.1 Ein Modell der Tumorentstehung	28
1.3.2 Die Rolle von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen in der Tumorentstehung 30	
1.4 MAPK Signalkaskade.....	32
1.4.1 Der RAS-RAF-MEK-ERK Signalweg	32
1.4.2 Struktureller Aufbau und RAS-abhängige Aktivierung von RAF	34
1.5 Das maligne Melanom	36
1.5.1 Risikofaktoren und Entstehung des malignen Melanoms	37

1.5.2	Mutationen im ERK-Signalweg beim malignen Melanom	38
1.5.3	Pharmakologische Inhibitoren des ERK-Signalweges	39
2	Ziel der Arbeit	41
3	Material und Methoden.....	42
3.1	Material	42
3.1.1	<i>Bakterienstämme</i>	42
3.1.2	<i>Nährmedien</i>	42
3.1.3	<i>Antibiotika</i>	42
3.1.4	<i>Eukaryotische Zelllinien.....</i>	43
3.1.5	<i>Zellkulturmedium und Zusätze</i>	44
3.1.6	<i>Antikörper und Farbstoffe.....</i>	44
3.1.7	<i>Biochemikalien und Chemikalien.....</i>	45
3.1.8	<i>Vektoren und Plasmide</i>	47
3.1.9	<i>Komplettsysteme.....</i>	47
3.1.10	<i>Oligonukleotide</i>	48
3.1.11	<i>Verbrauchsmaterialien</i>	50
3.1.12	<i>Geräte.....</i>	50
3.1.13	<i>Software.....</i>	51
3.2	Methoden.....	52
3.2.1	<i>Molekularbiologische Methoden.....</i>	52
3.2.2	<i>Zellbiologische Methoden.....</i>	57
3.2.3	<i>Proteinbiochemische Methoden</i>	71
4	Ergebnisse	77
4.1	Epigenetische Regulation von <i>HTRA1</i> durch MBD2.....	77
4.1.1	Vergleich der HTRA-Genexpression in HCT116 und SW480 Kolonkarzinomzellen.....	77
4.1.2	Nachweis einer CpG-Insel (CpGI) im HTRA2- und HTRA3-Promotor.....	78

4.1.3	Methylierungsanalyse des HTRA2- und HTRA3-Promotors	81
4.1.4	Die HTRA-Genexpression nach dem knockdown von MBD2	84
4.1.5	MBD2 bindet an den HTRA1-Promotor	86
4.2	HTRA1-Genexpression und Methylierung in Melanom-Zelllinien.....	90
4.2.1	Vergleich der HTRA1- und HTRA2-Genexpression in Melanom-Zelllinien	91
4.2.2	Methylierungsanalyse des HTRA1-Promotors in Melanom-Zelllinien.....	92
4.2.3	Melanom-Einzelzellklone mit niedriger HTRA1-Genexpression zeigen eine sehr geringe DNA-Methylierung am HTRA1-Promotor	95
4.3	Charakterisierung der Melanom-Einzelzellklone	97
4.3.1	Bestätigung der Mutationen durch Sequenzierung	98
4.3.2	Stimulierung der Melanom-Zelllinien mittels IGF	100
4.3.3	Hemmung der BRAF V600E Zellen mittels PLX4032	101
4.3.4	Genexpression und Proteinlevel von HTRA1, BRAF und NRAS in den Melanom-Einzelzellklonen.....	102
4.3.5	Lokalisation von HTRA1 in Melanom-Einzelzellklonen	106
4.3.6	Melanom-Einzelzellklon mit niedriger HTRA1-Expression zeigt eine erhöhte Polyploidie	108
4.4	In vitro Charakterisierung der HTRA1-RAF Interaktion.....	110
4.4.1	Reinigung von GST-CRAF-RBD	110
4.4.2	Reinigung von GST-BRAF-Kinase	111
4.4.3	HTRA1 interagiert mit CRAF-RBD und der BRAF-Kinase-Domäne in vitro	112
4.4.4	Synthetische RAF-Peptide haben keinen Einfluss auf die proteolytische Aktivität von HTRA1	117
4.5	Charakterisierung der HTRA1-RAF Interaktion in Melanomzellen	119
4.5.1	HTRA1 interagiert mit der rekombinanten CRAF-RBD und der Kinase-Domäne von BRAF in Melanomzellen.....	119
4.5.2	Koimmunpräzipitation von endogenem HTRA1 und RAF-Proteinen aus Melanomzellen	123

4.5.3	Immunfluoreszenz-Färbungen zeigen eine Kolokalisation von HTRA1 und BRAF in Melanomzellen.....	124
4.6	Funktionelle Effekte von HTRA1 auf den ERK-Signalweg	126
4.6.1	Die CRAF-RBD wird in vitro von HTRA1 abgebaut	127
4.6.2	Eine Aktivierung der ERK-Signalkaskade verstärkt die Interaktion zwischen HTRA1 und BRAF	128
4.6.3	Unterschiede in der HTRA1-Expression haben keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von MEK und ERK	130
4.6.4	Proliferationsverhalten der Melanomzellen nach Hemmung der ERK-Signalkaskade	131
5	Diskussion	135
5.1	MBD2 bindet an den <i>HTRA1</i> -Promotor in Kolonkarzinomzellen	135
5.2	Der <i>HTRA3</i> -Promotor ist in Kolonkarzinomzellen hypermethyliert.....	138
5.3	In den Melanomzellen wird die Genexpression von <i>HTRA1</i> nicht epigenetisch reguliert	140
5.4	Zelluläre Verteilung von HTRA1 in Melanomzellen.....	142
5.5	BRAF als neuer Interaktionspartner von HTRA1 in Melanomzellen.....	144
5.5.1	Die CRAF-RBD und BRAF-Kinase-Domäne sind in vitro-Interaktionspartner für HTRA1.....	144
5.5.2	Endogenes HTRA1 und BRAF interagieren in Melanom-Zelllinien	145
5.6	Das Proliferationsverhalten der Melanom-Einzelzellklone nach Hemmung von BRAF bzw. MEK und der Einfluss von HTRA1	147
6	Zusammenfassung	151
7	Abstract.....	152
	Literaturverzeichnis	155
	Lebenslauf	169

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1: Die Proteine der HtrA-Proteasen.....	17
Abb. 1-2: Chemische Modifikation von Cytosin.....	23
Abb. 1-3: Direkte und indirekte Inhibierung der Genexpression als Folge der DNA-Methylierung.....	24
Abb. 1-4: Die häufigsten posttranslationalen Histonmodifikationen.....	26
Abb. 1-5: Modell der klonalen Expansion über somatische Mutationen	31
Abb. 1-6: Die drei humanen MAPK-Signalkaskaden.....	32
Abb. 1-7: Schematische Darstellung der ERK-Signalkaskade	33
Abb. 1-8: Die humanen RAF-Isoformen und ihre Phosphorylierungsstellen.....	35
Abb. 4-1: Genexpression von <i>HTRA1</i> , <i>HTRA2</i> und <i>HTRA3</i> in HCT116 und SW480 Zelllinien	78
Abb. 4-2: <i>In silico</i> -Analyse des <i>HTRA2</i> - und <i>HTRA3</i> -Promotors.....	80
Abb. 4-3: Schematische Darstellung und DNA-Methylierung der <i>HTRA2</i> -Promotorregion...	82
Abb. 4-4: Schematische Darstellung und DNA-Methylierung der <i>HTRA3</i> -Promotorregion...	83
Abb. 4-5: Genexpression von <i>MBD2</i> , <i>HTRA1</i> , <i>HTRA2</i> und <i>HTRA3</i> in HCT116-Zellen	85
Abb. 4-6: Zellkernlysate nach Ultraschallbehandlung	87
Abb. 4-7: Anreicherung von MBD2 und Anteil der H3K9-Acetylierung am <i>HTRA1</i> -Promotor	88
Abb. 4-8: Positiv- und Negativ-Kontrollen der durchgeführten ChIP-Experimente.....	90
Abb. 4-9: Genexpression von <i>HTRA1</i> und <i>HTRA2</i> in Melanom-Zelllinien	92
Abb. 4-10: Methylierungsanalyse des <i>HTRA1</i> -Promotors in Melanom-Zelllinien.....	94
Abb. 4-11: Methylierungsanalyse von Melanom-Einzelzellklonen.....	96
Abb. 4-12: Sequenzierungs-Chromatogramme der <i>BRAF</i> - und <i>NRAS</i> -Gene der Einzelzellklone	99
Abb. 4-13: Immundetektion von phospho-MEK und phospho-ERK nach IGF-Behandlung	101
Abb. 4-14: Immundetektion von phospho-MEK und phospho-ERK nach PLX-Behandlung	102

Abb. 4-15: Genexpression von <i>HTRA1</i> , <i>BRAF</i> und <i>NRAS</i> in Melanom-Einzelzellklonen...	104
Abb. 4-16: Immundetektion von <i>HTRA1</i> , <i>BRAF</i> , <i>BRAF V600E</i> und <i>NRAS</i> in Melanom-Einzelzellklonen.....	105
Abb. 4-17: Immunfluoreszenzfärbung von <i>HTRA1</i> in <i>BRAF V600E</i> Melanom-Einzelzellklonen	106
Abb. 4-18: Lokalisation von <i>HTRA1</i> in Melanom-Einzelzellklonen	107
Abb. 4-19: FACS-Analyse von WT-Melanomzellen nach Synchronisierung durch Serumentzug.....	109
Abb. 4-20: Reinigung von GST-RBD	111
Abb. 4-21: Reinigung der <i>BRAF</i> -Kinase-Domäne.....	112
Abb. 4-22: Schematische Darstellung des <i>in vitro</i> GST-Pulldown Assays.....	113
Abb. 4-23: <i>In vitro</i> Interaktion von <i>HTRA1</i> Δ macSA mit immobilisierten <i>RAF</i> -Proteinen	114
Abb. 4-24: <i>In vitro</i> Interaktion von immobilisiertem <i>HTRA1</i> Δ macSA und der GST- <i>BRAF</i> -Kinase	115
Abb. 4-25: <i>In vitro</i> Interaktion von <i>HTRA1</i> Δ PDZ SA und immobilisierten <i>RAF</i> -Proteinen...	116
Abb. 4-26: <i>In vitro</i> Interaktion von <i>HTRA1</i> Δ macSA und immobilisiertem GST	117
Abb. 4-27: Proteolytischer Abbau von β -Casein durch <i>HTRA1</i> Δ mac nach Zugabe von <i>RAF</i> -Peptiden.....	118
Abb. 4-28: GST-Pulldown Assay in Melanom-Zelllinien und Immundetektion von <i>RAS</i>	120
Abb. 4-29: Schematische Darstellung des GST-Pulldown Assays mit zellulärem Proteinextrakt	121
Abb. 4-30: GST-Pulldown Assay in Melanom-Zelllinien und Immundetektion von <i>HTRA1</i> .	122
Abb. 4-31: Immunpräzipitation von <i>HTRA1</i> aus Melanom-Zelllinien	123
Abb. 4-32: Immunpräzipitation von <i>BRAF</i> aus Melanom-Zelllinien	124
Abb. 4-33: Lokalisation von <i>NRAS</i> , <i>BRAF</i> und <i>HTRA1</i> in Melanom-Zelllinien	126
Abb. 4-34: Proteolytischer Verdau der RBD durch <i>HTRA1</i> Δ mac	127
Abb. 4-35: Immunpräzipitation von <i>BRAF</i> aus WT-Melanomzellen nach IGF-Behandlung	128

Abb. 4-36: Immunpräzipitation von BRAF aus WT-Melanomzellen nach Serumentzug und IGF-Behandlung.....	129
Abb. 4-37: Immundetektion von phospho-MEK, phospho-ERK und HTRA1 in Melanomzellen	130
Abb. 4-38: Zellproliferation der Melanom-Einzelzellklone nach Zugabe von PLX4032 und/oder des MEK-Inhibitors GSK1120212	132
Abb. 4-39: Steigung der Zellproliferation der Melanom-Einzelzellklone nach Zugabe von PLX4032 und/oder des MEK-Inhibitors GSK1120212	134

Tabellenverzeichnis

Tab. 3-1: Verwendete Bakterienstämme	42
Tab. 3-2: Verwendete Antibiotika.....	42
Tab. 3-3: Verwendete eukaryotische Zelllinien	43
Tab. 3-4: Verwendete Primärantikörper	44
Tab. 3-5: Verwendete Sekundärantikörper und Farbstoffe	45
Tab. 3-6: Verwendete Antikörper für ChIP	45
Tab. 3-7: Verwendete Enzyme	46
Tab. 3-8: Verwendete synthetische Peptide	46
Tab. 3-9: Verwendete Protein- und Nukleinsäurestandards.....	46
Tab. 3-10: Verwendete Plasmide	47
Tab. 3-11: Verwendete Komplettsysteme	47
Tab. 3-12: Verwendete Oligonukleotide für die BRAF-und NRAS Genotypisierung.....	48
Tab. 3-13: Verwendete qPCR-Oligonukleotide	48
Tab. 3-14: Verwendete Oligonukleotide für BSP.....	49
Tab. 3-15: Verwendete Oligonukleotide für ChIP-qPCR	49
Tab. 3-16: Ansatz für eine BSP	55
Tab. 3-17: Pipettierschema für die Genotypisierungs-PCR.....	56
Tab. 3-18: Kulturbedingungen der häufig verwendeten Zelllinien	57
Tab. 3-19: Pipettierschema für eine ChIP-qPCR-Reaktion	63
Tab. 3-20: Konzentration und Auslesetemperaturen der ChIP-qPCR <i>Primer</i>	63
Tab. 3-21: Verwendete Antikörper für Immunpräzipitation	65
Tab. 3-22: Verwendete Erstantikörper und Farbstoffe für die Immunfluoreszenz.....	67
Tab. 3-23: Pipettierschema für eine qPCR-Reaktion	70
Tab. 3-24: Konzentration, Auslesetemperatur und Effizienz der verwendeten <i>Primer</i>	70
Tab. 3-25: Anzuchtbedingungen für die Reinigung der RAF-Proteine.....	74

Tab. 3-26: Verwendete Proteine für den <i>in vitro</i> GST-Pulldown Assay	76
Tab. 4-1: Genotyp und <i>HTRA1</i> -Expression der ausgewählten Melanom-Einzelzellklone.....	98

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
5-Aza	5-Aza-2'-Deoxycytidin
Abb.	Abbildung
Ac	Acetylierung
ALT	<i>alternative lengthening of telomeres</i>
AMD	altersbedingte Makuladegeneration
AP2α	<i>adaptor-related protein complex 2 alpha</i>
APC	<i>adenomatous polyposis coli</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
Bp	Basenpaare
BRAF	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma protein homolog B</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
BSP	Bilsufit Sequenzierungs PCR
CADASIL	<i>Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
cm	Zentimeter
CpG	CpG-Insel
Da	Dalton

DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's modified medium</i>
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DNMT	DNA-Methyltransferasen
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMT	epithelial- mesenchymale Transition
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinase</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDF	<i>growth differentiation factor</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GST	Glutathion S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
H	Histon
HDAC	Histone-Deacetylase
HtrA	<i>high temperature requirement A</i>
IAP	<i>inhibitor of apoptosis family of proteins</i>
IGF	<i>insulin growth factor</i>
IGFBP	<i>insulin growth factor binding protein</i>
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton

KI	Proteaseinhibitordomäne
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma</i>
l	Liter
log	Logarithmus
LV	Leervektor
M	Molar
MBD	Methyl-CpG-bindende Domäne
MAPK	<i>mitogen- activated protein kinases</i>
MeCP2	<i>methyl CpG binding protein 2</i>
MEK	<i>mitogen-activated protein kinase ERK</i>
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger RNA</i>
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
NRAS	<i>neuroblastoma rat sarcoma</i>
NuRD	<i>nucleosome remodeling deacetylase</i>
NZA	NZ-Amin
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDZ	<i>postsynaptic density protein 95-Discs large-Zona occludens 1</i>
ph	Phospho
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
qPCR	<i>quantitative Real-Time-PCR</i>
RB	<i>retinoblastoma protein</i>

RBD	RAS-Bindedomäne
RibProtL13A	ribosomales Protein L13A
rpm	rotations per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAM	S-Adenosyl-Methionin
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamid gel electrophoresis
shRNA	small hairpin RNA
SS	Signalsequenz
SWI/SNF	<i>switch/sucrose non fermentable</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>
T _m	<i>melting temperature</i>
TM	Transmembrandomäne
TSG	Tumorsuppressorgen
TSA	Trichostatin A
ÜN	über Nacht
V	Volt
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Die Familie der HtrA-Serinproteasen

Proteasen umfassen mehrere Gruppen von peptidspaltenden Enzymen, die fundamentale Aufgaben in zellulären Prozessen erfüllen. Sie spielen eine Rolle bei der Degradation von fehlgefalteten sowie beschädigten Proteinen und sie übernehmen regulatorische Funktionen durch den Abbau von Signalproteinen. Außerdem fungieren sie selbst als intrazelluläre sowie extrazelluläre Signalproteine und regulieren dadurch essentielle Prozesse wie Apoptose, Zellmigration, -proliferation, -wachstum, -differenzierung und Immunantwort.

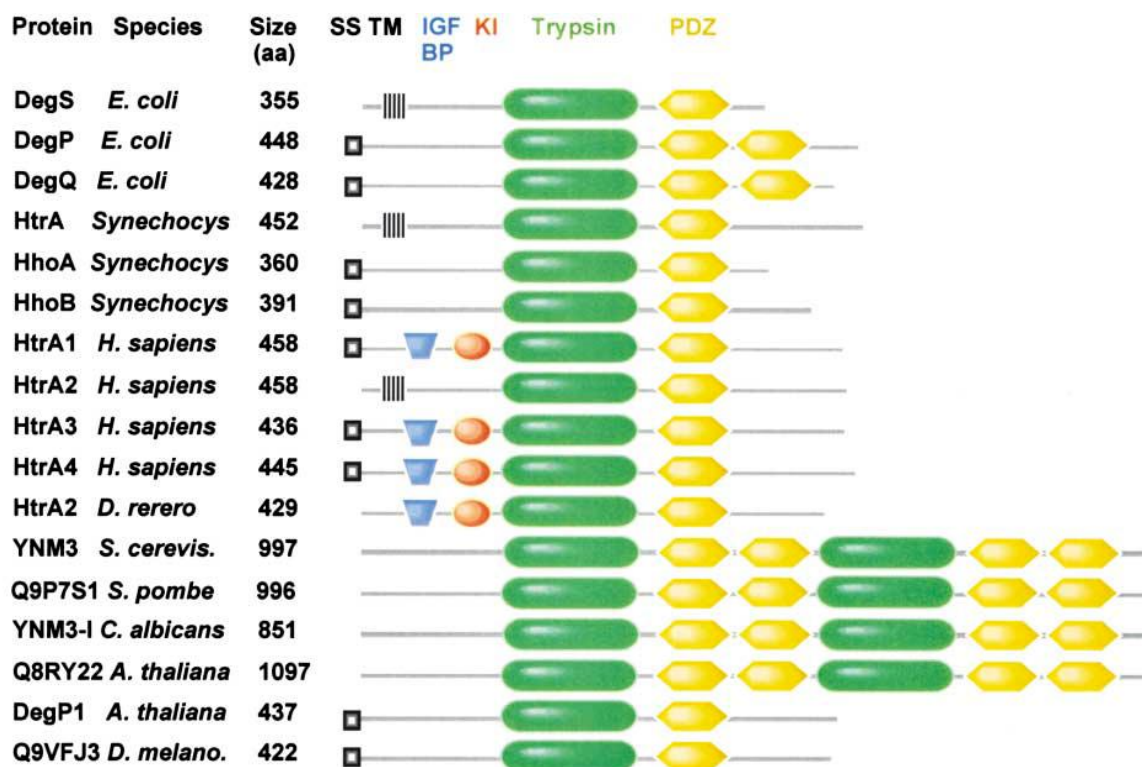


Abb. 1-1: Die Proteine der HtrA-Proteasen

Die HtrA-Proteine sind in Prokaryonten und Eukaryonten zu finden. Einige Mitglieder besitzen N-terminal eine Signalsequenz (SS), eine Transmembrandomäne (TM), eine IGFBP-ähnliche Domäne (IGFBP) und eine Kazal-ähnliche Proteaseinhibitor-domäne (KI). Als gemeinsames Merkmal weisen alle Mitglieder eine Trypsin-ähnliche katalytische Domäne (Trypsin) und ein oder mehrere PDZ-Domänen (PDZ) auf. (Clausen et al., 2002)

Die HtrA-Proteine gehören zu einer Familie hochkonservierter oligomerer Serinproteasen, die ursprünglich in *Escherichia coli* (*E. coli*) beschrieben worden sind (Lipinska et al., 1988; Strauch et al., 1989) und zentrale Aufgaben in der zellulären Proteinqualitätskontrolle übernehmen. Ein strukturelles Merkmal der HtrA-Familie ist das Vorhandensein einer trypsinähnlichen katalytischen Domäne und mindestens einer C-terminalen PDZ-Domäne, über welche sequenzspezifische Protein-Protein Interaktionen zu den Zielsubstraten der HtrAs vermittelt werden (Harris and Lim, 2001). Der variable N-Terminus weist bei einigen HtrA-Proteinen eine Signalsequenz auf. Ein weiteres Merkmal der HtrA-Proteasen liegt in ihrer reversiblen Aktivierung und in ihrer ATP-unabhängigen proteolytischen Aktivität (Clausen et al., 2002).

1.1.1 Die humanen HTRAs

Bisher sind vier humane Homologe der HtrA-Proteasen identifiziert worden, hierbei handelt es sich um HTRA1, HTRA2, HTRA3 und HTRA4. Die Proteasen HTRA1, HTRA3 und HTRA4 weisen zusätzlich zu der oben beschriebenen Domänenstruktur eine Signalsequenz für die Sekretion in den extrazellulären Raum und eine IGFBP7-Domäne auf (Clausen et al., 2002). HTRA2 hingegen besitzt als mitochondriales Protein zusätzlich eine Transmembranhelix. HTRA1-3 sind bereits näher charakterisiert worden, wohingegen HTRA4 kaum untersucht wird. Daher wird im Folgenden nicht näher auf HTRA4 eingegangen.

1.1.2 HTRA1

Die sekretorische Protease HTRA1 hat ein Molekulargewicht von 50 kDa und zeigt ein besonders hohes Expressionslevel in der Placenta, den Ovarien, Endothelzellen, Fibroblasten und in der Epidermis (De Luca et al., 2003). Trotz der vorhandenen Signalsequenz ist HTRA1 auch im Zytoplasma vorzufinden und es sind sowohl extra- als auch intrazelluläre Interaktionspartner beschrieben. *HTRA1* ist ursprünglich als ein herunter reguliertes Gen in SV-40 transformierten Fibroblasten identifiziert worden (Zumbrunn and Trueb, 1996). Weitere Arbeiten haben gezeigt, dass die *HTRA1*-Genexpression auch im Ovarialkarzinom, Endometrialkarzinom, hepatozellulärem Karzinom, Mesotheliom sowie im Melanom stark herunter reguliert wird (Baldi et al., 2002; Baldi et al., 2008; Mullany et al., 2011; Shridhar et al., 2002; Zhu et al., 2010). Die geringe *HTRA1*-Genexpression führt in Ovarialkarzinomzelllinien zu einem erhöhten Zellwachstum und einer erhöhten Resistenz gegenüber den Chemotherapeutika Cisplatin und Paclitaxel (Chien et al., 2006; Chien et al., 2004b), im Endometrialkarzinom zu einem höheren Grad der Entdifferenzierung (Bowden et

al., 2006) und beim Lungenkarzinom sowie im Melanom zu einer gesteigerten Metastasierung (Baldi et al., 2002; Esposito et al., 2006). Eine Erhöhung der *HTRA1*-Genexpression führt dagegen zu einer Inhibierung der Proliferation, Chemoinvasion und dem Tumorwachstum u.a. in Melanom-Zelllinien (Baldi et al., 2002), so dass der HTRA1-Protease tumorsuppressive Eigenschaften zugesprochen werden.

Die Herunterregulation von *HTRA1* im Tumorgewebe ist zum einem mit dem Verlust der Heterozygotität (*loss of heterozygosity*) des Gens in Verbindung gebracht worden und zum anderen sind epigenetische Mechanismen, wie DNA-Hypermethylierung des *HTRA1*-Promotors beschrieben worden, die zum Gen-*silencing* führen (Chien et al., 2004b; Narkiewicz et al., 2008). Mutationen im *HTRA1*-Gen resultieren außerdem in einer verringerten proteolytischen Aktivität und zeigen eine positive Korrelation mit der Entwicklung einer zerebralen autosomal-dominanten Arteriopathie (CADASIL) (Hara et al., 2009). Weiterhin sind Einzel-Nukleotid Polymorphismen in der Promotorregion von *HTRA1* mit einem erhöhten Auftreten der altersbedingten Makuladegeneration (AMD) in Verbindung gebracht worden (Dewan et al., 2006; Yang et al., 2006).

Ein molekularer Mechanismus, der die Beteiligung von HTRA1 in der Onkogenese erklärt, ist noch nicht beschrieben worden. Jedoch gibt es einige Arbeiten, die HTRA1 mit zellulären Prozessen und Signalwegen in Zusammenhang bringen.

Es wurde gezeigt, dass HTRA1 apoptotische Signale beeinflusst und dadurch am Zellüberleben beteiligt ist. Hierfür ist die proteolytische Aktivität von HTRA1 essentiell (Chien et al., 2004a). Außerdem korreliert eine HTRA1-induzierte Apoptose mit einer Erhöhung der Caspasen 3 und 7 (Chien et al., 2006).

In embryonalen Maus-Fibroblasten und retinalen Pigmentepithelzellen ist proteolytisch aktives HTRA1 in Verbindung mit dem p38-MAPK-Signalweg gebracht worden. Das Herbeiführen von oxidativem Stress führt in HTRA1-exprimierenden Zellen zu einer erhöhten Phosphorylierung von P38 und zugleich weisen diese Zellen ebenfalls ein erhöhtes Zellüberleben auf (Supanji et al., 2013).

Desweiteren beeinflusst HTRA1 die Onkogenese über Zellmotilität und Zellmigration. Es wurde beschrieben, dass HTRA1 ein Mikrotubuli-bindendes Protein ist und *in vitro* die Assemblierung der Mikrotubuli fördert. *In vivo* führt eine erhöhte HTRA1-Expression zu einer verringerten Zellmotilität (Chien et al., 2009), eine Beobachtung, die die tumorsuppressiven Eigenschaften von HTRA1 bestätigt.

In einem weiteren Mechanismus ist HTRA1 an der Regulation des TGF- β -Signalweges beteiligt. Hierbei bindet HTRA1 an Mitglieder der TGF- β -Familie, wie BMP4, TGF- β 2, TGF- β 1 und GDF5 und inhibiert so den TGF- β -Signalweg. Auch hier ist die Protease-Domäne von Bedeutung (Oka et al., 2004). Eine mögliche Erklärung für die Inhibierung des Signalweges liegt in der *in vitro* Beobachtung, dass TGF- β 1 von HTRA1 abgebaut werden kann (Launay et al., 2008).

In der extrazellulären Matrix sind einige Zielproteine beschrieben worden, die von HTRA1 degradiert werden. Dazu gehören u.a. Fibronectin, Collagen und amyloide Plaques (grau, richards, keer, 2006 + tsuchiya, yano, tocharus, 2005 + grau, baldi, bussani, 2005). In rheumatischen Erkrankungen scheint die erhöhte HTRA1-Expression den Verlauf der Krankheit zu fördern (Grau et al., 2006; Hu et al., 1998), wohingegen die HTRA1-Expression in der Alzheimerischen Erkrankung über den Abbau amyloider Plaques eine protektive Rolle übernimmt.

1.1.3 HTRA2

Die humane HTRA2-Protease ist hauptsächlich im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert und dort an der Proteinqualitätskontrolle beteiligt (Vande Walle et al., 2008). Eine weitere Lokalisation von HTRA2 ist im endoplasmatischen Retikulum und im Nukleus beschrieben worden (Faccio et al., 2000; Gray et al., 2000). HTRA2 ist unter physiologischen Bedingungen an der mitochondrialen Homöostase beteiligt. Der Verlust von HTRA2 führt zur Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen in den Mitochondrien, zu mitochondrialer Dysfunktion, zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, und zum Zelltod (Krick et al., 2008; Moiso et al., 2009). Unter dem Einfluss von zellulärem Stress zeigt HTRA2 proapoptotische Eigenschaften und induziert den apoptotischen Signalweg.

Während der Apoptose transloziert HTRA2 in das Zytosol und ist dort an der Degradation von Apoptose-hemmenden Proteinen wie XIAP, cIAP1, cIAP2 und Apollon/BRUCE beteiligt. Dies führt zur Aktivierung der Caspasen 3, 7 und 9 (Martins et al., 2002). Ebenso wie HTRA1 ist HTRA2 an einem Caspase-unabhängigen Apoptose-Signalweg beteiligt, wobei der Mechanismus noch nicht geklärt ist.

Mutationen im *HTRA2*-Gen, welche zur fehlenden oder verringerten proteolytischen Aktivität von HTRA2 führen, stehen in Zusammenhang mit dem Parkinson Syndrom und neurodegenerativen Erkrankungen (Strauss et al., 2005).

Die Rolle von HTRA2 in der Onkogenese ist ebenfalls ungeklärt, wobei die Regulation von apoptotischen Signalen einen möglichen Zusammenhang darstellt. Die Genexpression von

HTRA2 in Tumorgewebe ist zelltypspezifisch. Eine geringe Expression wurde im Ovarialkarzinom und Endometrialkarzinom beschrieben (Narkiewicz et al., 2008; Narkiewicz et al., 2009b), wohingegen eine erhöhte Expression im Prostatakarzinom und Adenokarzinomen gezeigt wurde (Hu et al., 2006; Lee et al., 2003).

1.1.4 *HTRA3*

HTRA3 wurde ursprünglich als ein hoch reguliertes Gen in der murinen Embryonal- und Plazentaentwicklung beschrieben (Nie et al., 2003b). Die hohe Homologie, und strukturelle Ähnlichkeit zu *HTRA1* lassen vermuten, dass beide Proteasen ähnliche und ergänzende biologische Funktionen aufweisen. Mit Ausnahme von einer erhöhten Expression während der Plazentaentwicklung unterscheiden sich *HTRA1* und *HTRA3* jedoch stark in ihrem Expressionsmuster, so dass zelltypspezifische Aufgaben nahe liegen (De Luca et al., 2004; Nie et al., 2003b).

Eine Genexpressionsanalyse hat gezeigt, dass *HTRA3* Tabakzigarettenrauch-abhängig hochreguliert wird, wohingegen die Genexpressionen von *HTRA1* und *HTRA2* unverändert bleiben (Jorgensen et al., 2004). Im Lungenkarzinom ist eine deutlich reduzierte Genexpression von *HTRA3* beschrieben worden, welche über die DNA-Hypermethylierung des *HTRA3*-Promotors erklärt wird (Beleford et al., 2010a). Weiterhin ist in Lungenkarzinomzelllinien gezeigt worden, dass auch *HTRA3* die Sensitivität gegenüber den Chemotherapeutika Etoposid und Cisplatin erhöht und *HTRA3* hier Protease-abhängig eine Rolle im Apoptose-Signalweg spielt (Beleford et al., 2010b).

Ähnlich zur *HTRA1*- und *HTRA2*-Genexpression ist auch *HTRA3* im Ovarialkarzinom und Endometrialkarzinom stark erniedrigt (Narkiewicz et al., 2008; Narkiewicz et al., 2009b). Im Endometrialkarzinom korreliert diese mit einem höheren Grad der Entdifferenzierung (Bowden et al., 2006).

Neben der Beteiligung am Apoptose-Signalweg im Zytoplasma ist auch *HTRA3* an der Degradation von extrazellulären Proteinen beteiligt. Zum einen bindet und inhibiert es ebenfalls Proteine aus der TGF- β -Familie und zum anderen zeigt es gegenüber den extrazellulären Matrix-Proteinen Decorin und Biglycan eine proteolytische Effizienz, die vergleichbar mit der von *HTRA1* ist (Tocharus et al., 2004).

1.2 Regulation der Genexpression über epigenetische Mechanismen

Der Begriff „Epigenetik“ wurde erstmalig von Conrad Waddington (1905-1975) verwendet, um zelluläre Ereignisse zu erklären, die nicht über genetische Prinzipien zu erklären waren. Ein Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und Genfunktion wurde 1971 von Scarano und später von Holliday und Pugh (1975) und Riggs (1975) vorgestellt. Die Epigenetik bildet eine Brücke zwischen dem Genotyp und Phänotyp eines Organismus und wird definiert als die Folge von stabilen oder auch vererbbaaren Veränderungen in der Genexpression, die nicht über eine Veränderung in der chromosomalen Basenpaarsequenz erfolgen. In einem Organismus sind genetische Informationen gleichbleibend, wohingegen sich die epigenetischen Informationen zwischen Zelltyp, Entwicklungsstand und äußeren Einflüssen unterscheiden. Epigenetische Effekte spielen physiologisch in der frühen embryonalen Entwicklung und X-Chromosom-Inaktivierung eine Rolle (Kafri et al., 1992; Wolf et al., 1984), tragen jedoch in großem Maße auch zu pathophysiologischen Prozessen insbesondere der Onkogenese bei. Die DNA-Methylierung und posttranslationale Modifikationen der Histone sind hauptsächlich für epigenetische Effekte verantwortlich. Daher sollen diese im Folgenden näher erläutert werden.

1.2.1 DNA-Methylierung von CpG-Dinukleotiden

Die DNA-Methylierung stellt die häufigste epigenetische Modifikation im Genom von Säugetieren dar. Hierbei findet eine chemische Modifikation der Cytosine statt, die sich innerhalb von CpG-Dinukleotiden befinden. Chromosomale Bereiche die eine besonders hohe Dichte dieser CpG-Dinukleotide aufweisen werden als CpG-Inseln (CpGI) bezeichnet (Cooper et al., 1983; Gardiner-Garden and Frommer, 1987). Sie haben eine ungefähre Länge von 1 kbp, sind zu 60-70 % an Promotorregionen lokalisiert und die Methylierung der Cytosine hat meist eine Genrepression zur Folge (Larsen et al., 1992; Saxonov et al., 2006). Das gesamte Genom weist eine globale Methylierung der Cytosine auf, wohingegen der überwiegende Anteil an CpGI frei von Cytosin-Methylierungen bleibt. Es wurde vorgeschlagen, dass die CpGI als „Landelichter“ für Transkriptionsfaktoren eine Rolle spielen, damit diese die Promotorenregionen von den intergenischen Bereichen unterscheiden können (Prestridge and Burks, 1993). Nur ein geringer Anteil unterliegt im Laufe der Entwicklung einer spezifischen DNA-Methylierung. Die Methylierung der Cytosine erfolgt über sogenannte DNA-Methyltransferasen (DNMT), hierbei kommen entweder *de novo* DNMTs (DNMT3a und b) oder Erhaltungs-DNMTs (DNMT1) während der

DNA-Replikation zum Einsatz (Bestor et al., 1988; Okano et al., 1998). Die DNMTs katalysieren die Übertragung einer Methylgruppe vom S-Adenosyl-Methionin (SAM) auf das jeweilige Cytosin (Abb. 1-2).

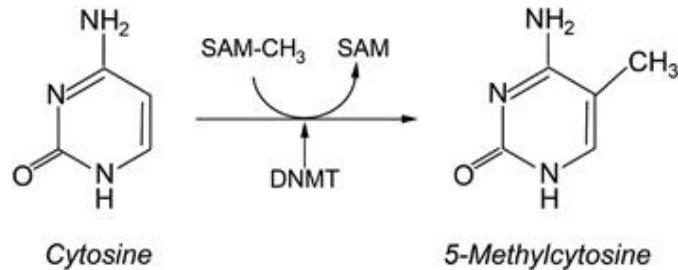


Abb. 1-2: Chemische Modifikation von Cytosin

Die innerhalb von CpG-Dinukleotiden liegenden Cytosine werden durch DNMTs chemisch modifiziert. Hierbei wird eine Methylgruppe von SAM übertragen. (Gibney and Nolan, 2010)

Unabhängig von Art der Methylierung korreliert diese stark mit einer Veränderung in der Genexpression, wobei es meist zu einer Hemmung der Genaktivität kommt. Die Genrepression kann direkt oder indirekt erfolgen (Abb. 1-3).

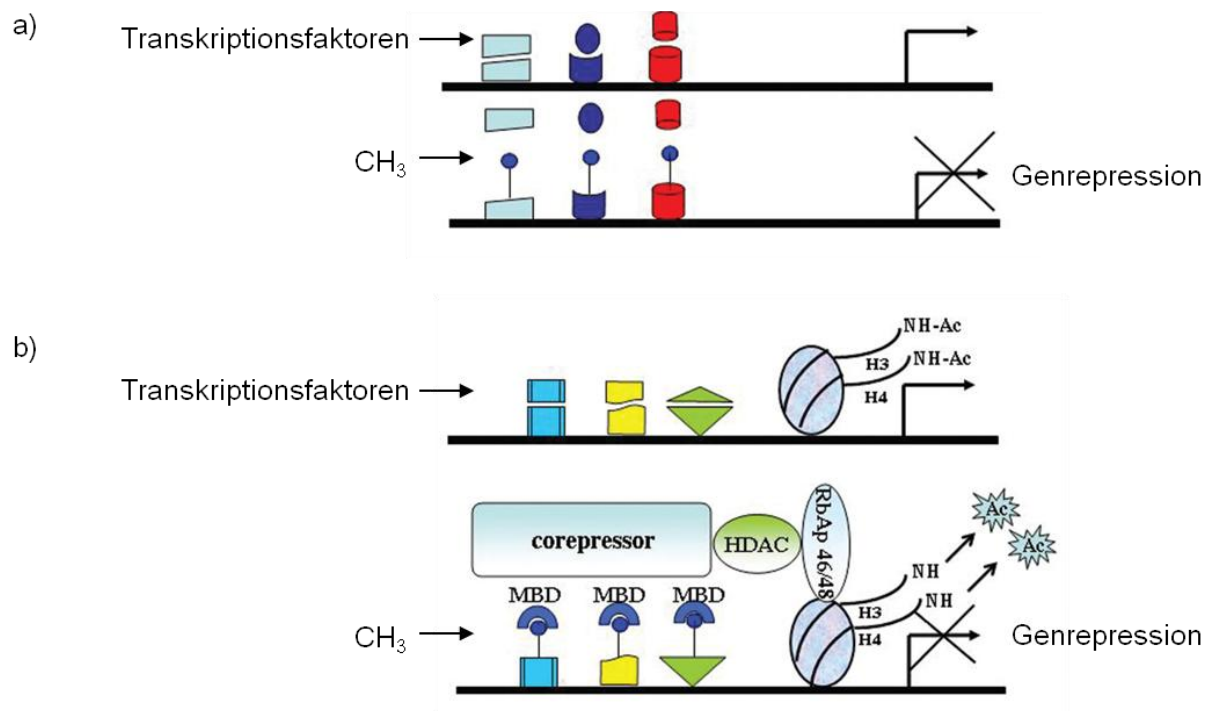


Abb. 1-3: Direkte und indirekte Inhibition der Genexpression als Folge der DNA-Methylierung

- a) Der Promotorbereich eines Gens beinhaltet Bindestellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren, welche die Genexpression regulieren. Bei der direkten Inhibition verhindern die durch DNMTs hinzugefügten CH₃-Gruppen am Cytosin die Bindung der Transkriptionsfaktoren und hemmen somit die Gentranskription.
- b) Bei der indirekten Inhibition binden anstelle von Transkriptionsfaktoren MBD-Proteine an die CH₃-Gruppen der Cytosine und rekrutieren u.a. Histondeacetylasen (HDACs). Dies führt zur Deacetylierung der Histone, zur Chromatinverdichtung und zur Geninaktivierung. Die Abbildung wurde modifiziert aus „Epigenetics and Chromatin, Springer Verlag, 2005.

Bei der direkten Inhibition verhindern die Methyl-Gruppen der Cytosine die Bindung von Transkriptionsfaktoren. Die DNA-Methylierung hat zusätzlich eine Verdichtung des Chromatins zur Folge, so dass die Bindestellen erschwert zugänglich sind. Die indirekte Inhibition erfolgt über Mediatoren, den DNA-Methyl-bindenden Proteinen (MBD).

1.2.2 DNA-Methyl-bindende Proteine

Die MBDs gehören einer Familie von Proteinen an, die alle eine DNA-Methyl-bindende Domäne aufweisen (Hendrich and Bird, 1998). Es sind insgesamt fünf humane MBD-Mitglieder identifiziert worden, dazu gehören MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3 und MBD4 (Hendrich and Bird, 1998; Lewis et al., 1992). Mit Ausnahme von MBD4, welches eine Rolle in der DNA-Reparatur zeigt (Hendrich et al., 1999), assoziieren die MBD-Proteine mit

Histondeacetylasen (HDAC) und verbinden DNA-Methylierung mit transkriptioneller Genrepression und Bildung von Heterochromatin (Ballestar and Wolffe, 2001). Strukturanalysen haben gezeigt, dass die Interaktion zu einer 12-bp langen palindromischen DNA-Sequenz mit einem integrierten methylierten CpG-Dinukleotid über eine hydrophobe Oberfläche der MBD-Domäne stattfindet (Wade and Wolffe, 2001). Neben der Sequenzfolge scheinen aber strukturelle Eigenschaften der nukleären Chromatin-Organisation eine größere Rolle für die spezifische Bindung der verschiedenen MBDs zu spielen (Ballestar et al., 2003). Zudem sind verschiedene Modelle vorgeschlagen worden, wo die Bindung der MBD-Proteine entweder Genlocus- oder Zelltypspezifisch ist. Höchstwahrscheinlich beeinflusst auch die Assoziation zu weiteren DNA-bindenden Proteinen die nukleäre Verteilung und Funktion der MBDs (Fatemi and Wade, 2006).

Unabhängig von ihrer Bindungsspezifität sind die MBD-Proteine Komponenten von Proteinkomplexen, welche u.a. HDACs und Chromatin-Remodeling-Proteine beinhalten und die Genrepression vermitteln. MeCP2 interagiert über Brahma mit dem SWI/SNF-Komplex (Harikrishnan et al., 2005), MBD2 und MBD3 sind im NuRD-Komplex nachgewiesen worden (Le Guezennec et al., 2006) und MBD1 war ursprünglich als ein Mitglied des MeCP1-Repressorkomplexes charakterisiert worden (Cross et al., 1997). Über die Bindung der MBD-Proteine an methylierte Cytosine und die Rekrutierung weiterer Proteine wird die Genrepression vermittelt. Die Deacetylierung der Histone und ATP-abhängige Nukleosom-Veränderungen führen weiterhin zur Bildung von repressivem Heterochromatin.

1.2.3 Histonmodifikationen

Das Nukleosom bildet die Kerneinheit des Chromatins und besteht aus einem Oktamer der vier Histone (H2A, H2B, H3, H4) und der darum gewickelten DNA. Die konservierten Kerne der Histone zeigen eine globuläre Struktur mit Ausnahme der variablen N-Termini.

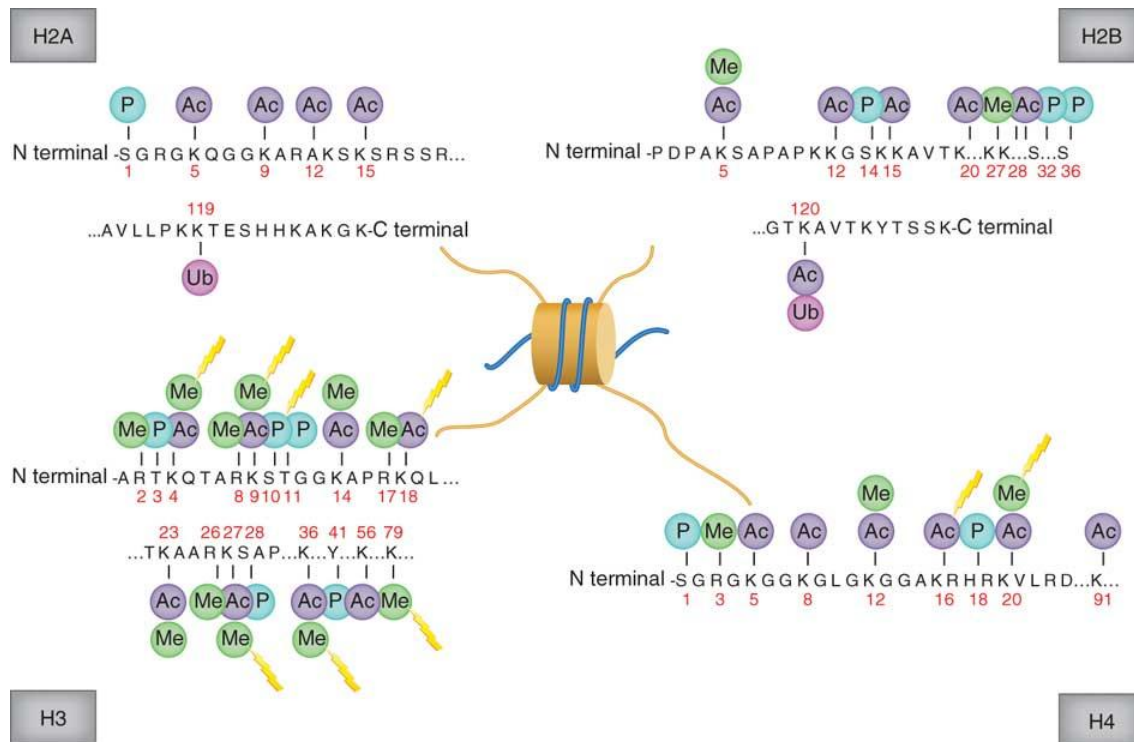


Abb. 1-4: Die häufigsten posttranslationalen Histonmodifikationen

Die DNA (blau) ist um das Nukleosom (gelb) herum angeordnet. Die sich außerhalb vom Nukleosom-Kern befindenden N-Termini und in geringerem Umfang auch die C-Termini der Histone, werden durch posttranslationale Modifikationen modifiziert (Ac = Acetylierung, P = Phosphorylierung, M = Methylierung, Ub = Ubiquitinierung). (Rodríguez-Paredes and Esteller, 2011)

Die Aminosäuren der N-Termini unterliegen verschiedenen Arten von Modifikationen, dazu gehören Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung, Sumoylierung und Ubiquitinierung (Kouzarides, 2007) (Abb. 1-4). Die Histone können mehrere Modifikationen gleichzeitig aufweisen und die Kombination der Modifikationen beschreibt den epigenetischen „Histon Code“, welcher zu einem eher geschlossenen und repressiven oder offenen und aktivem Chromatin führt (Li et al., 2007). So resultieren z.B. die Trimethylierung von H3K4, die Monomethylierung von H4K20 und die Acetylierung von H3K9 und H3K14 in einer Genaktivierung, wohingegen die Trimethylierung von H3K9 und H3K27 zu einer Genrepression führt (Barski et al., 2007; Li et al., 2007). Die Histonmodifikationen unterliegen dynamischen Veränderungen, die über physiologische oder auch pathophysiologische Prozesse reguliert werden.

1.2.4 Epigenetische Veränderungen in der Onkogenese

Epigenetische Veränderungen scheinen insbesondere in der Tumorgenese und Tumorprogression eine fundamentale Rolle zu spielen. 1982 wurde als erstes die

Hypomethylierung der DNA im Tumorgewebe identifiziert (Feinberg and Vogelstein, 1983). Es wurde gezeigt, dass CpG im nicht-transformierten Gewebe eine Methylierung aufweisen und im Tumorgewebe einer DNA-Hypomethylierung unterliegen (Strichman-Almashanu et al., 2002). Die Hypomethylierung und daraus resultierende Genaktivierung ist z.B. für das Onkogen *HRAS* gezeigt worden (Feinberg and Vogelstein, 1983) und auch für weitere Gene, die an der Zellproliferation beteiligt sind (Sato et al., 2003). Außerdem steht die DNA-Hypomethylierung mit einer Verringerung der DNA-Mismatch-Reparatur, chromosomaler Instabilität und einer Resistenz gegenüber Medikamenten im Zusammenhang (Lengauer et al., 1997; Nakayama et al., 1998). Neben der globalen Hypomethylierung trägt auch die Hypermethylierung bestimmter Genregionen maßgeblich zur Tumorgenese bei. Da die Hypermethylierung eine Genrepression zur Folge hat, handelt es sich hierbei meist um Tumorsuppressorgene (TSG). Die Arbeitsgruppe Horsthemke hat 1989 erstmals eine Hypermethylierung des Retinoblastoms mit einer direkten Geninaktivierung in Verbindung gebracht (Greger et al., 1989). Es folgten weitere Arbeiten, die eine Hypermethylierung und Genrepressionen von TSG in Tumorgeweben gezeigt haben. Dies hat u.a. dazu geführt, dass die Hypermethylierung als die bedeutendste epigenetische Veränderung im Tumorgewebe beschrieben wurde. Der Mechanismus, welcher zu einem veränderten Methylierungsmuster führt, ist jedoch nicht geklärt. Zum einen kann eine Änderung in der Genexpression der DNMTs zu fehlerhaften Methylierungen führen. Aber auch eine fehlerhafte Rekrutierung der DNMTs zu ihren Zielgenen kommt als möglicher Mechanismus in Frage. Weiterhin können Kontrollmechanismen gestört sein, welche in normalen Zellen die Ausbreitung der DNA-Methylierung verhindern. Schließlich wird auch die Transkription bestimmter Gene über Veränderungen der Histonmodifikationen reguliert. Eine besondere Rolle in der epigenetischen Genrepression spielt die Monomethylierung von H3K9 (Bachman et al., 2003). Diese Arbeit zeigt, dass p16^{INK4a} in Kolonkarzinomzellen trotz fehlender DNA-Methylierung über die Methylierung von H3K9 transkriptionell inhibiert werden kann. Das HP1-Protein bindet an die Methylgruppen der Histone und rekrutiert weitere Histonmethyltransferasen, so dass sich die Ausbildung von Heterochromatin über das Genom ausbreiten kann. Diese Enzyme sind ebenfalls Komponenten der MBD-Repressorkomplexe, so dass sich Histonmodifikationen und DNA-Methylierung in der epigenetisch-bedingten Genrepression stark gegenseitig beeinflussen. Epigenetische Prozesse sind jedoch nur ein Teil der Mechanismen, die zur Onkogenese beitragen.

1.3 Die maligne Transformation

Bei der malignen Transformation handelt es sich um die stufenweise Veränderung einer normalen Zelle zu einer Tumorzelle. Während dieses Prozesses findet eine Akkumulation von Veränderungen und Mutationen in der Zelle statt, die einen Selektionsvorteil für die Zelle bieten, so dass sich diese in ihrer Umgebung unter den gegebenen Bedingungen zu einer Tumorzelle entwickeln kann. Die Entstehung des malignen Melanoms ausgehend von einem Melanozyt bis hin zum metastasierenden Melanom ist ein Beispiel für das Stufenmodell der malignen Transformation (siehe Abschnitt 1.5.1). Die Dysregulation von Onkogenen und TSG spielt hierbei eine fundamentale Rolle und ihre Entdeckung in den frühen 1980er Jahren trägt heute maßgeblich zum Verständnis der Tumorentwicklung bei.

1.3.1 Ein Modell der Tumorentstehung

Im Jahre 2000 haben Hanahan und Weinberg sechs Eigenschaften einer Tumorzelle beschrieben, welche für die maligne Transformation von Bedeutung sind (Hanahan and Weinberg, 2000). Auf diese Eigenschaften wird im Folgenden näher eingegangen:

1. Chronische Proliferation

Nicht-transformierte Zellen unterliegen einer streng kontrollierten Proliferation, wobei über Wachstumsfaktoren und Cytokine das Zellwachstum genau reguliert wird. Tumorzellen entgehen den regulatorischen Mechanismen und proliferieren unkontrolliert und unabhängig von äußeren Faktoren (Hynes and MacDonald, 2009; Witsch et al., 2010). Dies erreichen die Tumorzellen entweder über eine autokrine Produktion von Wachstumsfaktoren, Überexpression von Wachstumsfaktor-stimulierenden Signalen, Überexpression der entsprechenden Membranrezeptoren, oder auch über strukturelle Veränderungen der Rezeptoren, so dass diese konstitutiv aktivierbar sind (Bhowmick et al., 2004). Die Fähigkeit einer Wachstumsfaktor-unabhängigen Proliferation kann ebenfalls über Mutationen in Signalwegen vermittelt werden. So sind konstitutiv aktive Mutationen u.a. sehr häufig im ERK-Signalweg zu beobachten (siehe Abschnitt 1.5.2).

2. Umgehen von Wachstumshemmern

Tumorzellen besitzen die Fähigkeit antiproliferative Mechanismen zu umgehen. Hier spielt insbesondere ein Funktionsverlust der zwei TSG RB (Retinoblastom) und TP53 eine Rolle. Sie fungieren als sogenannte *gatekeeper*-Proteine, welche das Fortschreiten des Zellzyklus kontrollieren (Burkhart and Sage, 2008; Sherr and McCormick, 2002). Während das RB-Protein den Zellzyklus als Antwort auf extrazelluläre Signale anhält, wird TP53 über

intrazelluläre Veränderungen, wie DNA-Schäden oder suboptimalem Nährstoffangebot, aktiviert. Eine weitere wichtige Rolle spielt die Repression von TGF β über Proto-Onkogene. In Tumorzellen übt die Stimulation von TGF β u.a. einen inhibitorischen Effekt auf den Zellzyklus aus (Ikushima and Miyazono, 2010).

3. Hemmung der Apoptose

Der programmierte Zelltod (Apoptose) reguliert die Zell-Homöostase und schützt den Organismus vor beschädigten Zellen. Tumorzellen haben jedoch eine Reihe von Ausweichmechanismen zum umgehen der Apoptose entwickelt. Der Prozess der Apoptose wird über ein Gleichgewicht an anti- (Bcl-2 Protein-Familie) und pro-apoptotischen (Bax und Bak) Proteinen reguliert (Adams and Cory, 2007). Die häufigste Erklärung einer fehlenden Apoptose ist der Verlust von TP53. Weiterhin weichen Tumorzellen der Apoptose durch die Überexpression von anti-apoptotischen bzw. der Inhibierung von pro-apoptotischen Proteinen aus.

4. Immortalität

Zusätzlich zur Inhibierung der Apoptose erlangen Tumorzellen die Fähigkeit zur unbegrenzten zellulären Proliferation (Immortalität). Eine entscheidende Funktion für die Stabilität der Chromosomen und Lebensdauer einer Zelle übernehmen die Telomere, die Enden der Chromosomen (Blasco, 2005). In nicht-immortalisierten Zellen verkürzen sich die Telomere nach jedem Replikationszyklus, bis eine kritische Telomerlänge erreicht ist, die eine ausreichende Protektion und ein Zellüberleben nicht mehr zulässt. In Tumorzellen ist jedoch eine gleichbleibende Telomerlänge zu beobachten. Diese ist zu über 90 % durch eine Überexpression des Enzyms Telomerase zu erklären, welche der Telomerverkürzung entgegenwirkt. Für Telomerase-negative Zellen ist der alternative ALT-Mechanismus (*Alternative Lengthening of Telomeres*) vorgeschlagen worden (Bryan et al., 1997; Bryan et al., 1995), welcher über Telomer-Telomer Rekombination die Länge der Telomere erhält (Dunham et al., 2000). Auch hier spielt wieder der Funktionsverlust von TP53 eine Rolle (Jiang et al., 2009).

5. Neoangiogenese

Angiogenese ist die Entstehung neuer Blutgefäße aus bereits vorhandenen Blutgefäßen. Physiologisch wird die Angiogenese während der Wundheilung und Embryonalentwicklung angeschaltet. Tumorzellen besitzen schon im frühen Stadium die Fähigkeit der Angiogenese, um autark vom umgebenden Gewebe zu überleben (Raica et al., 2009). Zudem sind Tumorzellen geprägt von deformierten, verlängerten, stark durchbluteten und verzweigten

Gefäßen. Die intensive Neubildung der Blutgefäße wird über pro- und anti-angiogenetische Signale reguliert. In einigen Tumorzellen vermitteln die Onkogene RAS oder MYC die Überexpression von pro-angiogenetischen Faktoren, wie die von VEGF (*vascular endothelial growth-factor*).

6. Aktivierung der Invasion und Metastasierung

Die Fähigkeit der Tumorzellen aus ihrem ursprünglichen Gewebe auszubrechen (Invasion) und über die Blutbahn in weitere Organe zu streuen (Metastasierung) deutet auf einen aggressiven Charakter des Tumors und auf einen geringen Behandlungserfolg hin. Für die Invasion findet eine Umstrukturierung des Zytoskeletts statt, um die äußere Zellform zu verändern. Außerdem werden Zell-Zellkontakte und Zell-Matrixkontakte entfernt, um sich vom Gewebe zu lösen. Hierbei spielt die Herunterregulation oder mutations-abhängige Inaktivierung des Adhäsionsproteins E-Cadherin in Tumorzellen eine große Rolle (Berx and van Roy, 2009). Der Prozess der Invasion und Metastasierung wird in einem schrittweisen Modell beschrieben, dabei beginnen die Tumorzellen mit einer lokalen Invasion, gehen über Blut- und Lymphgefäße in das hämatogene System über, dringen in fremde Gewebe ein (Extravasation), bilden dort die sogenannten Mikrometastasen aus und entwickeln sich schließlich zu makroskopischen Tumoren (Kolonisierung) (Hanahan and Weinberg, 2011). In Tumorzellen wird dabei der Prozess der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) aktiviert, wobei die Zellen die Fähigkeit zur Invasion, Migration und Streuung erlangen. Physiologisch spielt die EMT in der Embryonalentwicklung und Wundheilung eine Rolle. Eine Reihe von Transkriptionsfaktoren wie *SNAIL*, *SLUG* und *TWIST* beeinflussen die EMT und unterliegen einer veränderten Expression während der Tumorgenese (Micalizzi et al., 2010; Yang and Weinberg, 2008). Auch die Herunterregulation von *HTRA1* führt in Brustkrebszelllinien zu einem mesenchymalen Zellcharakter und zur Überexpression von EMT-spezifischen Genen (Wang et al., 2012).

1.3.2 Die Rolle von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen in der Tumorentstehung

Ein Tumor ist eine genetisch bedingte Krankheit, die sich durch das Entstehen von somatischen Mutationen entwickelt. Für die maligne Transformation reicht jedoch eine einzelne Mutation nicht aus, erst eine Akkumulation von etwa drei bis sechs Mutationen führt zur Entwicklung einer invasiven und metastasierenden Tumorerkrankung (Vogelstein and Kinzler, 1993). Hauptsächlich sind hierfür Mutationen in Onkogenen und TSG verantwortlich. Mutationen in Onkogenen führen zu konstitutiv aktiven Genprodukten, die durch chromosomale Translokationen, Genamplifikationen oder intragenische Mutationen ihren Ursprung finden. Das bekannteste Beispiel für eine aktivierende Mutation in humanen

Tumorzellen ist der Aminosäureaustausch an Position 600 von Valin zu Glutamat in der BRAF-Kinase. Die Zellen erhalten ein dauerhaftes Proliferationssignal. Bei den TSG führen die Mutationen zum entgegengesetzten Effekt, nämlich zur Inaktivierung oder Reduzierung der Proteinfunktion. Hierfür sind Gendeletionen und Geninsertionen, die zu verkürzten Proteinen führen, *missense* Mutationen oder epigenetisches *Silencing* (siehe Abschnitt 1.2.4) verantwortlich. Die Mutationen in TSG führen zur Inhibierung der Zellzykluskontrolle und der Apoptose (Vogelstein and Kinzler, 2004). Die häufigsten Inaktivierungen von TSG, die zur Tumورprogression beitragen, sind im Retinoblastom und TP53 zu beobachten. Die erste somatische Mutation in einem Onkogen oder TSG wird als Initiations-Mutation bezeichnet, durch sie beginnt der Transformationsprozess. Es folgen weitere somatische Mutationen die in einer klonalen Expansion und Tumورprogression resultieren. Durch die Akkumulation von Mutationen entstehen Subklone, welche die Fähigkeit zur Metastasierung besitzen (Abb. 1-5).

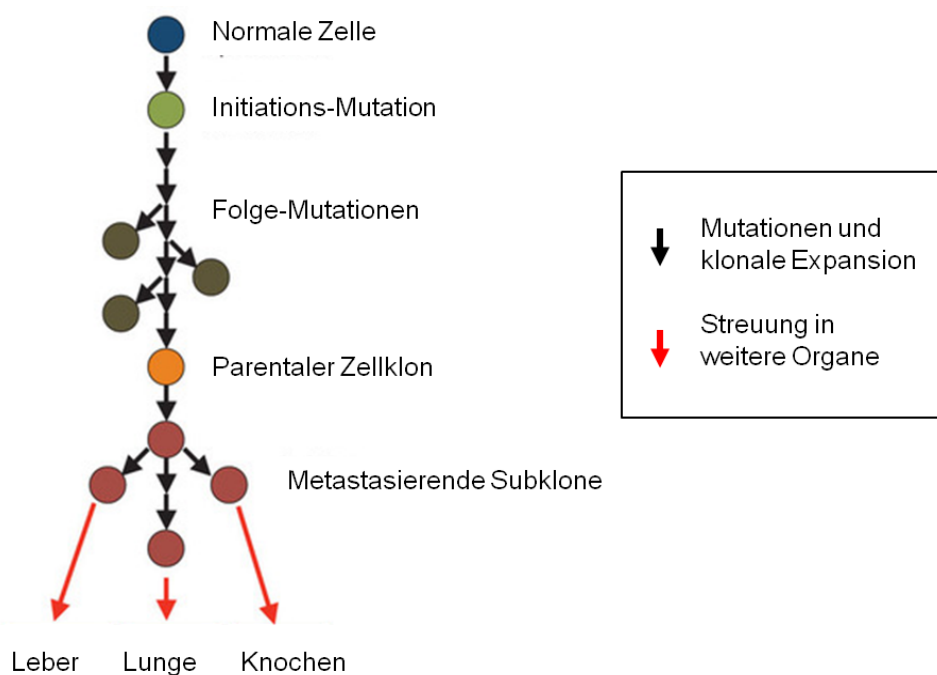


Abb. 1-5: Modell der klonalen Expansion über somatische Mutationen

Die Transformation einer normalen Zelle findet über mehrere somatische Mutationen statt. Jede einzelne bietet dem Tumor einen selektiven Vorteil. Die metastasierenden Subklone haben schließlich die Fähigkeit zur Streuung in weitere Organe. Die Abbildung wurde modifiziert nach (Yachida et al., 2010).

1.4 MAPK Signalkaskade

Die Mitogen-aktivierten-Protein-Kinasen (MAPK) sind Serin- oder Threoninkinasen, die in den MAPK Signalkaskaden über Phosphorylierungen extrazelluläre Stimuli im Zytoplasma weiterleiten. In humanen Zellen sind drei verschiedene MAPK Signalwege identifiziert worden: der extrazellulär Signal-regulierte Kinase (ERK)-, der Jun Kinase (JNK/SAPK) und der p38-Signalweg (Widmann et al., 1999). Die Kaskaden bestehen aus mindestens drei aufeinanderfolgenden Kinasen, deren Aktivierung zu verschiedenen zellulären Antworten führt (Abb. 1-6). Hierzu gehören Zellproliferation, -migration, -differenzierung, -überleben, Apoptose, Immunantworten und Transformation (Dhillon et al., 2007; McCubrey et al., 2006).

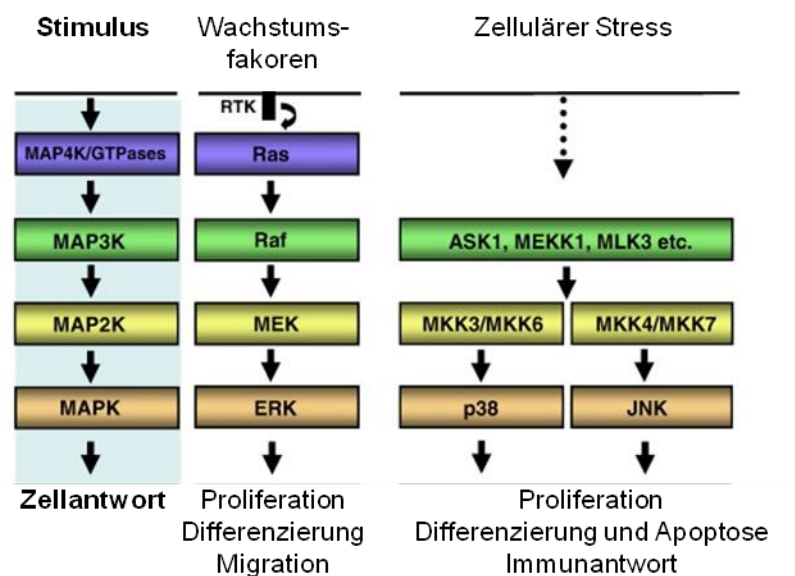


Abb. 1-6: Die drei humanen MAPK-Signalkaskaden

Die MAPK Signalwege bestehen aus mindestens drei MAPK (links). Über die Bindung eines extrazellulären Stimulus wird die intrazelluläre Phosphorylierungskaskade aktiviert. Die Effektorkinasen ERK, P38 und JNK phosphorylieren mehrere Zielsubstrate, über welche dann zelluläre Prozesse reguliert werden. (Kim and Choi, 2010)

Der ERK-Signalweg wird über Wachstumsfaktoren aktiviert, wohingegen der P38- und JNK-Signalweg primär durch Cytokine und zellulärem Stress aktiviert werden.

1.4.1 Der RAS-RAF-MEK-ERK Signalweg

Der RAS-RAF-MEK-ERK Signalweg (im Folgenden als ERK-Signalweg bezeichnet) ist der bestuntersuchte MAPK Signalweg (Abb. 1-7) und spielt in der vorliegenden Arbeit eine wichtige Rolle, daher wird dieser im Folgenden näher erläutert.

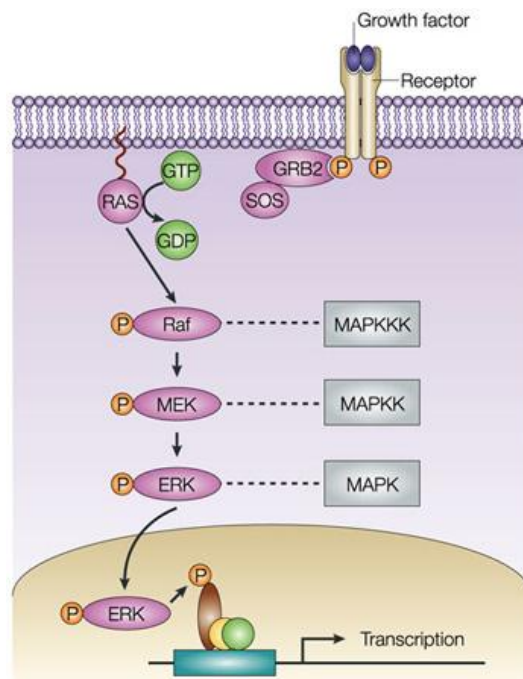


Abb. 1-7: Schematische Darstellung der ERK-Signalkaskade

Wachstumsfaktoren binden an Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) und aktivieren über eine Dimerisierung und Autophosphorylierung des Rezeptors die intrazelluläre Signalkaskade. Über Adapterproteine wie GRB2 wird membrangebundenes RAS rekrutiert und durch SOS findet der Austausch von GDP zu GTP statt. GTP-gebundenes RAS bindet dann an die RBD von RAF. Dadurch aktiviertes RAF wiederum aktiviert MEK über Phosphorylierung und MEK aktiviert die Effektor kinase ERK ebenfalls über Phosphorylierung. ERK hat Zielsubstrate sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern. (Kim and Bar-Sagi, 2004)

Er kann über verschiedene Wachstumsfaktoren, wie EGF (*epidermal growth factor*), FGF (*fibroblast growth factor*), HGF (*hepatocyte growth factor*) und IGF (*insulin-like growth factor*) stimuliert werden (Garrington and Johnson, 1999; Meier et al., 2005). Die Bindung eines Liganden an den entsprechenden Tyrosinkinase-Transmembranrezeptor resultiert in einer Dimerisierung der Rezeptoren und einer Welle von intrazellulär lokalisierten Autophosphorylierungen. Die Phosphotyrosine stellen Bindestellen für Adapterproteine wie GRB2 (*growth factor receptor-bound protein 2*) dar. GRB2 rekrutiert den Guanin-Nukleotidaustauschfaktor SOS (*son of sevenless*), welcher für die Aktivierung der Membran-gebundenen GTPase RAS sorgt (Vigil et al., 2010). Durch den Austausch von GDP zu GTP ändert sich die Konformation von RAS, so dass RAS-GTP mit der RAS-Bindedomäne (RBD) und der CRD (*cysteine rich domain*) der RAF-Kinasen (MAPKKK) interagieren kann. Dabei wird zytosolisches RAF zur Plasmamembran rekrutiert und es finden mehrere Phosphorylierungen statt, welche zur vollständigen Aktivierung von RAF beitragen (siehe Abschnitt 1.4.2). Die aktivierten RAF-Proteine aktivieren und phosphorylieren anschließend die zwei MAPKK MEK1 und MEK2 (S217 und S222 in MEK1)

(Marais et al., 1997). Obwohl es Hinweise auf weitere Effektoren gibt, sind MEK1 und MEK2 bisher die einzig wissenschaftlich bestätigten Substrate der RAF-Proteine. MEK1 und MEK2 phosphorylieren und aktivieren schließlich die beiden MAPK ERK1 und ERK2 (T202 und Y204 in ERK1). Erst die duale Phosphorylierung führt zur vollständigen Aktivierung der ERKs, für welche im Gegensatz zu den MEKs zahlreiche Substrate im Zellkern, Zytoplasma als auch in subzellulären Kompartimenten beschrieben worden sind (Pearson et al., 2001). Die ERKs sind an der Phosphorylierung und Regulierung zytoplasmatischer Proteinkinasen beteiligt und durch ihre Translokation in den Zellkern und der dortigen Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren regulieren sie auch die Genexpression. Im Zellkern phosphorylieren sie direkt Mitglieder der ETS-Transkriptionsfaktoren, dies führt zur Expression von weiteren Transkriptionsfaktoren, Zellzyklus-regulierenden Genen, Apoptose-regulierenden Genen und Wachstumsfaktoren. Weitere direkte Substrate sind die Transkriptionsfaktoren AP-1 und c-Myc. Eine indirekte Regulation erfolgt über die Phosphorylierung der zytoplasmatischen Kinase RSK (*Ribosomal S6 Kinase*) oder auch über die Aktivierung von IKK (*Inhibitor of κ B Kinase*), dies führt entsprechend zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren CREB oder NF κ B und zur Expression von Genen, welche die Zellproliferation steigern und die Apoptose hemmen (Chang et al., 2003). Zytosolische Substrate von ERK führen zusätzlich zu einem negativen Rückkopplungsmechanismus. Durch die ERK-abhängige Phosphorylierung von SOS wird u.a. der GRB2-SOS Komplex destabilisiert und die Interaktion zu RAS gehemmt (Kamioka et al., 2010).

Der ERK-Signalweg wird meist als eine einfache geradlinige Kaskade abgebildet, welche jedoch durch die Beteiligung von weiteren RAF-bindenden Proteinen und *scaffold*-Proteinen weit mehr Komplexität erhält. So führt die Bindung von 14-3-3-Proteinen an RAF zu einer vermehrten Heterodimerisierung und Stabilisierung der Kinase-Aktivität (Light et al., 2002; Rushworth et al., 2006; Tzivion and Avruch, 2002). Ein stabilisierender Effekt von BRAF V600E ist zudem über die Interaktion mit HSP90 gezeigt worden (Grbovic et al., 2006). Zusätzlich wird die Aktivität, Spezifität und räumliche Regulation der ERK-Signalkaskade über *scaffold*-Proteine, wie KSR1 (*kinase suppressor of Ras1*), MP1 (*MEK partner-1*), β -Arrestins oder IQGAP1 (*IQ motif-containing GTPase activating protein 1*) reguliert (Kolch, 2005), so dass die Zelle spezifisch auf gegebene Stimuli reagieren kann.

1.4.2 Struktureller Aufbau und RAS-abhängige Aktivierung von RAF

Die RAS-abhängige Aktivierung der RAF-Kinasen ist ein hochkomplexer Prozess und benötigt eine Vielzahl von Phosphorylierungsereignissen. Der Prozess beginnt mit der Bindung von Membran-lokalisiertem und GTP-gebundenem RAS. Die vier identifizierten

humanen RAS-Proteine HRAS, NRAS, KRASA und KRASB zeigen deutliche Unterschiede in ihrer Bindungsaffinität zu den verschiedenen RAF-Proteinen (Weber et al., 2000). Durch diese Eigenschaft und die zelluläre Verteilung der RAS-Proteine ist eine erste differentielle Regulation gegeben (Hancock, 2003). Es sind drei humane RAF-Isoformen beschrieben worden, dazu gehören ARAF, BRAF und CRAF (Abb. 1-8). Die RAF-Proteine weisen drei konservierte Regionen (CR) auf, wovon CR1 und CR2 im N-Terminus liegen und CR3 im C-Terminus. CR1 beinhaltet die RAS-Binde-Domäne und CR3 die Kinase-Domäne. In dieser Arbeit wird die Kinase-Domäne von BRAF (AA 457-717) und die RBD von CRAF (AA 56-131) als GST-fusioniertes Protein verwendet. Für die Rekrutierung von RAF zur Plasmamembran wird *in vivo* die Bindung von GTP-RAS an die RBD und CRD benötigt, wohingegen für *Pulldown*-Experimente die RBD ausreicht, um aktives RAS-Protein zu präzipitieren (Bondeva et al., 2002).

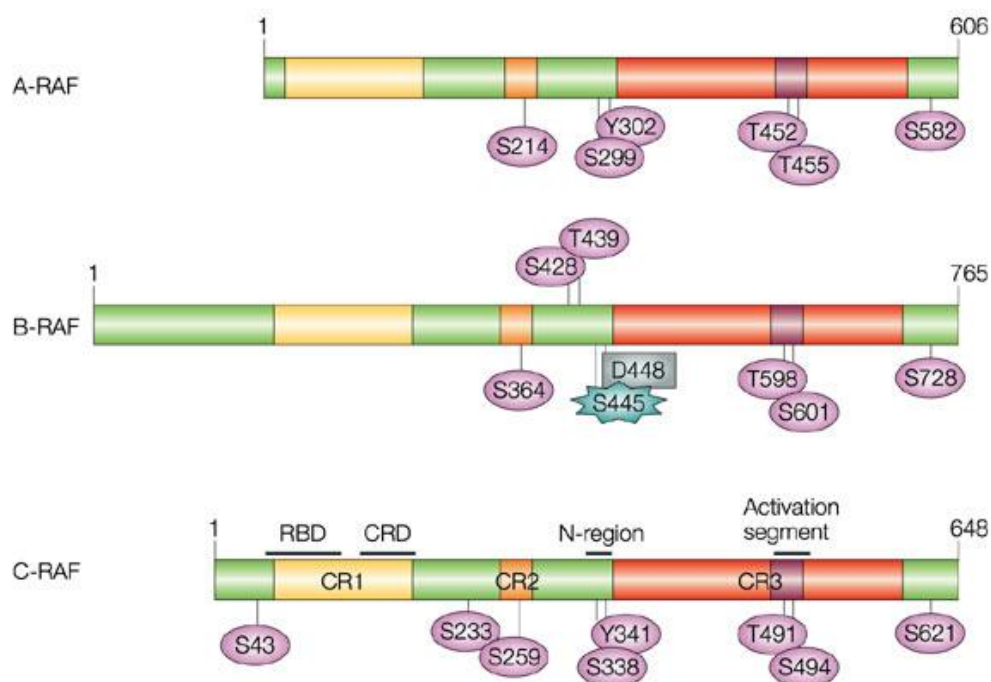


Abb. 1-8: Die humanen RAF-Isoformen und ihre Phosphorylierungsstellen

Die RAF-Isoformen ARAF, BRAF und CRAF zeigen drei konservierte Regionen: CR1 (gelb), CR2 (orange) und CR3 (rot). CR1 beinhaltet die RAS-Binde-Domäne (RBD) und die Cystein-reiche Domäne (CRD). Die Negativ-geladene regulatorische Domäne (N-Region) befindet sich *upstream* von CR3 (ARAF: Y302, BRAF: D448, CRAF: Y341). Die katalytische Einheit (lila) ist in CR3 lokalisiert. Die abgebildeten Aminosäuren unter den jeweiligen Isoformen sind bekannte Phosphorylierungsstellen. (Wellbrock et al., 2004)

Zahlreiche Aminosäuren der RAF-Proteine können phosphoryliert werden, einige sind innerhalb der Isoformen hochkonserviert andere wiederum nicht. Dies spricht für einen allgemein konservierten Regulationsmechanismus und für eine unabhängige Regulierung der unterschiedlichen Isoformen. Die RAF-Proteine zeigen eine sehr geringe intrinsische Aktivität, welche strukturell aufgrund der Überlagerung der Kinase-Domäne durch den N-Terminus erklärt werden kann (Wellbrock et al., 2004). Eine größere Rolle scheint jedoch der N-Terminus über die Rekrutierung zur Plasmamembran durch die Bindung von RAS an die RBD zu spielen (Marais et al., 1997). Letztendlich führen die Phosphorylierungen und Homo- und Heterodimerisierungen der RAF-Proteine zur vollständigen Aktivierung (Marais et al., 1995; Matallanas et al., 2011). Bei CRAF gehört die Dephosphorylierung der drei inhibitorischen Phosphorylierungsstellen an S43, S233 und S259 zum Aktivierungsprozess. Für die Bindung der 14-3-3-Proteine an den C-Terminus ist die Phosphorylierung an S621 essentiell (Light et al., 2002). Weiterhin werden die Aminosäuren S338 und Y342 durch PAK- bzw. SRC-Kinasen phosphoryliert und schließlich führt die vermutete Autophosphorylierung von T491 und S494 in der katalytischen Domäne zur Aktivierung (King et al., 1998; Marais et al., 1997). Die Aktivierung von ARAF scheint aufgrund der fünf konservierten Phosphorylierungsstellen ähnlich zu verlaufen (Marais et al., 1997). Unterschiede sind in der Aktivierung von BRAF gezeigt worden, denn hier sind lediglich vier konservierte Phosphorylierungsstellen vorhanden und drei von diesen weisen eine vergleichbare Funktion wie bei CRAF auf. Dazu gehören S728 (S621 in CRAF) für die Bindung der 14-3-3-Proteine und die beiden Phosphorylierungen in der katalytischen Domäne T598 und S601 (Zhang and Guan, 2000). Die durch die N-Region vermittelte Regulation unterscheidet sich in BRAF, zum einen ist das Äquivalent von Y341 in CRAF durch ein Aspartat an Position 448 ausgetauscht und zum anderen unterliegt S445 (S338 in CRAF) einer konstitutiven Phosphorylierung (Mason et al., 1999). Dies hat zur Folge, dass weniger Ereignisse notwendig sind, die zur Aktivierung von BRAF beitragen. Eine weitere Konsequenz für Tumorzellen scheint hiervon auch das häufige Auftreten von Einzelmutationen in BRAF zu sein, im Gegensatz zu dem Auftreten von Mutationen in ARAF und CRAF. Denn aufgrund der erhöhten basalen Kinase-Aktivität ist eine Mutation ausreichend, um BRAF in den konstitutiv aktiven Zustand zu bekommen.

1.5 Das maligne Melanom

Das maligne Melanom (schwarzer Hautkrebs) ist ein bösartiger Hauttumor, der aus Melanozyten epidermalen Ursprungs entsteht oder aus deren Vorläuferzellen, die aus dem Neuralrohr hervorgehen (Bennett, 1993). Melanozyten sind pigmentbildende Zellen, welche

in Abhängigkeit von ultravioletten Strahlen Melanin bilden und dieses an umgebende Keratinozyten abgeben. Die chirurgische Entfernung des Tumorgewebes in einem frühen Stadium verspricht hohe Heilungschancen, da jedoch die Bildung des Primärtumors sehr rasch fortschreitet und zugleich die verfügbaren medikamentösen Therapien nicht mehr ansprechen, sinkt die durchschnittliche Überlebensrate nach der Metastasierung auf sechs Monate (Miller and Mihm, 2006) und die 5-Jahres Überlebensrate beträgt weniger als 5 % (Cummins et al., 2006). Im Gegensatz zu vielen anderen Tumorarten tritt das Melanom häufig bei Personen mittleren Alters auf (Tsao et al., 2004).

Die Pathogenese des malignen Melanoms wird in dem sogenannten „Clark-Modell“ beschrieben (Clark et al., 1984). Hierbei werden histopathologische Merkmale berücksichtigt, die während der Initiation und Progression des Melanoms zu beobachten sind. Der erste Schritt ist eine Ansammlung von hyperproliferierenden Melanozyten an der Basalmembran, die in einem **benignen Nävus** resultieren. Das anfänglich vermehrte Wachstum wird durch die Induktion der Seneszenz gestoppt, so dass hieraus eher selten direkt Melanome entstehen. Die Vorstufe des Melanoms ist erst mit dem nächsten Schritt gegeben, dem **dysplastischen Nävus**. Anormales Wachstum der Melanozyten führt zu zytologisch atypischen Zellen, welche durch eine asymmetrische Form, unscharfe Ränder und Verfärbungen auf der Haut sichtbar werden. Der Übergang zur malignen Transformation ist durch die **radiale Wachstumsphase** (*radial growth phase; RGP*) gegeben. In der dritten Stufe erlangen die atypischen Zellen die Fähigkeit intraepidermal zu proliferieren. Im nächsten Schritt, der sogenannten **vertikalen Wachstumsphase** (*vertical growth phase; VGP*), gelingt es den Zellen die Basalmembran zu durchbrechen, um in tieferliegende Hautschichten einzudringen. Sie sind dann in der Lage in die Dermis und in das Fettgewebe zu wandern und können aufgrund ihrer unkontrollierten Proliferation weitere Tumore ausbilden. In der letzten Stufe können die Melanozyten in umliegende Hautareale und Organe einwandern. Das **metastasierende Melanom** kann sich dann sowohl lymphatisch als auch über die Blutgefäße im Körper ausbreiten.

1.5.1 Risikofaktoren und Entstehung des malignen Melanoms

Der einzige umweltbedingte Risikofaktor für die Entstehung eines Melanoms stellt die Exposition gegenüber ultraviolettem Licht dar. Da die vergleichsweise helleren Hauttypen stärker betroffen sind, ist das Melanom die am stärksten zunehmende maligne Erkrankung der weißen Bevölkerungsgruppe (Garbe and Leiter, 2009). Wobei hier paradoxerweise Personen, die häufig dem Sonnenlicht ausgesetzt sind, weniger betroffen sind als Personen mit geringerer Strahlenbelastung (Tucker and Goldstein, 2003). Durch die Strahlenbelastung

kommt es zu DNA-Schäden. Diese in Kombination mit einem defekten DNA-Reparatursystem führen zu einer Anhäufung von genetischen Mutationen. Die entarteten Melanomzellen weisen beinahe ausnahmslos Dysregulationen in drei molekularen Signalwegen auf, dabei handelt es sich um den ERK-Signalweg, p16^{INK4a}-CDK4-RB Signalweg und ARF-TP53 Signalweg. Die Dysregulation wird über Mutationen der jeweilig beteiligten Proteine vermittelt, wobei entweder Onkogene (z.B. NRAS, BRAF, CDK4, MITF) aktiviert oder TSG (z.B. ARF, PTEN, TP53) inaktiviert werden (Dahl and Guldberg, 2007). In einem hypothetischen Modell werden die Signalwege den Stufen der Melanomprogression zugeordnet. In dem Modell spielt die Aktivierung des ERK-Signalweges in der frühen Phase der Melanomentstehung eine Rolle, da dieser zur Zellproliferation beiträgt. Die Inaktivierung der p16^{INK4a}-CDK4-RB und ARF-TP53 Signalwege führt dann zu einer Anhäufung von DNA-Schäden bei gleichzeitig aktivem Zellzyklus. Zugleich sind die prämaligen Zellen in der Lage der eigentlich schützenden Seneszenz zu umgehen. Schließlich trägt die Aktivierung des PI3-AKT Signalweges zur Invasion und Metastasierung der entarteten Zellen bei (Dahl and Guldberg, 2007).

Neben den genetischen Ereignissen sind epigenetische Veränderungen für die Genese und Progression des Melanoms verantwortlich. In Melanomzellen sind für mehrere Gene veränderte DNA-Methylierungsmuster beschrieben worden. Eine Hypermethylierung ist u.a. für folgende Promotorregionen beschrieben worden: *MGMT*, *APC*, *PTEN* und *CDKN1B* (Furuta et al., 2004; Hoon et al., 2004; Worm et al., 2004).

Einige der in dieser Arbeit verwendeten Melanom-Zelllinien tragen entweder eine Mutation im *BRAF*- oder *NRAS*-Gen, daher werden auf diese beide Mutationen im Folgenden näher eingegangen.

1.5.2 Mutationen im ERK-Signalweg beim malignen Melanom

Über 90 % aller malignen Melanome weisen eine Hyperaktivierung der Effektorkinase ERK auf (Cohen et al., 2002). Die Hyperaktivierung kann über die Produktion von autokrinen Wachstumsfaktoren induziert werden oder auch durch somatische Mutationen in den Rezeptoren der Wachstumsfaktoren (Satyamoorthy et al., 2003; Willmore-Payne et al., 2005). Häufiger sind jedoch konstitutiv aktive somatische Mutationen der Onkogene *NRAS* und *BRAF* für die Hyperaktivierung und damit für eine gesteigerte Proliferation und erhöhtes Zellüberleben verantwortlich.

Die GTPase *NRAS* wurde als erstes verändertes Gen in Melanomzellen identifiziert und weist bei 15-30 % der Melanome eine Mutation auf. Die Mutation betrifft den Austausch von

Glutamin an der Aminosäureposition 61 meistens durch Leucin, Arginin oder Lysin (Q61L/R//K) (Davies et al., 2002). Dieser Aminosäureaustausch führt zu einer Verringerung der Hydrolyse-Aktivität der GTPase und somit verbleibt das RAS-Protein dauerhaft in der GTP-gebundenen, aktiven Konformation. Die Isoformen KRAS und HRAS sind ebenfalls in anderen Tumorarten mutiert. Das äußerst seltene Auftreten im Melanom spricht dafür, dass die Aktivität der verschiedenen RAS-Proteine Zelltyp-abhängig ist (Whitwam et al., 2007).

Ein weitaus häufigerer Aminosäureaustausch von etwa 50-70 % ist in der Serin-Threonin-Kinase BRAF zu beobachten (Davies et al., 2002). In über 90 % der Fälle findet eine Substitution von Valin zu Glutamat an der Aminosäureposition 600 statt (V600E) (Jönsson et al., 2007). Das phosphomimetische Glutamat führt zu einer Konformationsänderung in der Aktivierungsdomäne, welche dann in einer konstitutiven erhöhten Kinase-Aktivität resultiert (Wan et al., 2004). Das häufige Auftreten von BRAF V600E in benignen und dysplastischen Nävi unterstreicht die Funktion dieser Mutation in der frühen Melanomentstehung (Pollock et al., 2003). Die Aktivierung des ERK-Signalweges ist aber noch nicht ausreichend für eine maligne Entartung (siehe Absatz 1.5.1) und in klinischen Studien wirken sich die BRAF/NRAS Mutationen in einem Primärtumor nicht negativ auf die Überlebensrate aus. Wohingegen das Auftreten der BRAF und NRAS Mutationen im metastasierten Gewebe mit einem schlechteren Krankheitsverlauf korreliert (Houben et al., 2004). Interessanterweise treten auch die NRAS Q61K und BRAF V600E Mutationen im Melanom äußerst selten in Kombination auf (Goel et al., 2006). Diese Beobachtung spricht wiederum dafür, dass jede einzelne Mutation den Signalweg ausreichend genug aktivieren kann.

1.5.3 *Pharmakologische Inhibitoren des ERK-Signalweges*

Da die ERK-Signalkaskade aus mehreren Komponenten besteht, sind auch die Therapieansätze beim Melanom sehr vielfältig. Dabei verfolgen alle Ansätze das Ziel den Signalweg zu hemmen, um die gesteigerte Proliferation der malignen Zellen zu reduzieren. Als erstes wurden RAS-Farnesyl-Inhibitoren klinisch eingesetzt, welche eine essentielle posttranslationale Modifikation der RAS-Proteine verhindern. Die BRAF-Kinase stellt das nächste Ziel in der Signalkaskade dar. Hierfür wurden Kinase-Inhibitoren wie z. B. Sorafenib oder CHIR-265 entwickelt. Beide Arten von Inhibitoren zeigen einen geringen Erfolg. Werden sie jedoch in Kombination mit den Chemotherapeutika Cisplatin, Carboplatin oder Paclitaxel eingesetzt, erhöht sich der Behandlungserfolg (Flaherty, 2006; Smalley and Eisen, 2003). Beim Einsatz von BRAF-Inhibitoren kommt es unter bestimmten Bedingungen dazu, dass andere RAF-Proteine die Funktionen von BRAF übernehmen. So findet z.B. in RAS-mutierten Melanomzellen eine Aktivierung von MEK über CRAF anstelle von BRAF

statt (Dumaz et al., 2006). Zur spezifischen Behandlung von metastasierenden Melanomen wird der Kinasehemmer Vemurafenib (PLX4032) eingesetzt. Er hemmt selektiv die mutierte Form von BRAF (V600E), wohingegen in Wildtyp-Melanomzellen eine Signalaktivierung beobachtet wurde (Joseph et al., 2010). Desweiteren wurden die MEK-Inhibitoren GSK1120212, PD0325901 und AZD6244 entwickelt, welche noch in klinischen Studien erforscht werden. *In vitro* inhibieren sie in Melanomzellen die Proliferation, das Tumorstadium, die Formation von Zellkolonien und die Migration (Collisson et al., 2003; Gilmartin et al., 2011). Interessanterweise zeigen auch BRAF-mutierte Melanomzellen eine höhere Sensitivität gegenüber MEK-Inhibitoren als NRAS-mutierte Melanomzellen.

2 Ziel der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit soll der epigenetische Mechanismus, der für die Herunterregulation von *HTRA1* in Kolonkarzinomzellen verantwortlich ist, identifiziert werden. Es wurde bereits gezeigt, dass im *HTRA1*-Promotor eine CpGI lokalisiert ist. Diese Region weist in einer Kolonkarzinomzelllinie eine stark ausgeprägte Methylierung der DNA auf und zudem korreliert diese mit einer niedrigen *HTRA1*-Genexpression. Das DNA-Methyl-bindende Protein MBD2 ist mit der Regulation von *HTRA1* in Zusammenhang gebracht worden, daher soll in dieser Arbeit mit Hilfe von Chromatin-Immunpräzipitationen die Bindung von MBD2 an den *HTRA1*-Promotor analysiert werden. Zusätzlich sollen die Promotorbereiche von weiteren *HTRA*-Genen hinsichtlich des Vorhandenseins einer CpGI, deren Grad an DNA-Methylierung und Genexpression in Kolonkarzinomzellen untersucht werden.

Eine weitere Zielsetzung dieser Arbeit ist es, die Rolle von *HTRA1* in Melanomzellen zu charakterisieren. Hierfür sollen aus Patienten gewonnene primäre Melanom-Zelllinien untersucht werden, um neue Erkenntnisse über die Funktion von *HTRA1* und ihre mögliche klinische Bedeutung in der Tumorgenese zu erhalten.

Die Arbeit von Baldi *et al.* (Baldi *et al.*, 2002) hat gezeigt, dass das *HTRA1*-Gen im Melanom gering exprimiert wird. Daher soll zunächst über DNA-Methylierungsanalysen ein ebenfalls möglicher epigenetischer Regulationsmechanismus in den Melanomzellen untersucht werden.

Die häufig auftretenden Mutationen im *NRAS*- bzw. *BRAF*-Gen spielen für die Tumorprogression im Melanom eine große Rolle. Über eine Peptid-Bindestudie wurden die C-Termini von RAF-Proteinen als potentielle Bindepertner für die PDZ-Domäne von *HTRA1* ermittelt. Es soll daher mit Hilfe von GST-Pulldown Experimenten und Immunpräzipitationen überprüft werden, ob *HTRA1* *in vitro* und *in vivo* in den Melanomzellen mit *BRAF* eine Interaktion eingeht. Weiterhin soll durch biochemische und zellbiologische Methoden geklärt werden, ob *HTRA1* als ein potentieller Regulator im ERK-Signalweg fungiert. Ausgehend von der heterogenen Tumormasse sollen hierfür Melanom-Einzelzellklone generiert werden, um solche Klone zu identifizieren, welche eine hohe und geringe *HTRA1*-Genexpression aufweisen.

Ferner soll mit Hilfe der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie die zelluläre Lokalisation von *HTRA1* in den Melanomzellen und eine mögliche Kolokalisation mit *BRAF* dargestellt werden. Bei dieser Analyse soll die Kolokalisation insbesondere im Zusammenhang mit den unterschiedlichen Genotypen der Melanomzellen betrachtet werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Bakterienstämme

Folgende Bakterienstämme wurden für allgemeine Arbeiten (Überexpression, Klonierung) verwendet:

Tab. 3-1: Verwendete Bakterienstämme

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp	Herkunft
Dh5α	<i>F</i> -, <i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> , [Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15], <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , (<i>res</i> -, <i>mod</i> +), <i>deoR</i>	(Hanahan, 1983)
BL21(DE3) <i>plysS</i>	<i>F</i> -, <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (<i>r_B</i> -, <i>m_B</i> -), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , λ (DE3), <i>pLysS</i> , <i>Cm_r</i>	(Studier and Moffatt, 1986)
Rosetta2	<i>F ompT hsdS_B</i> (<i>r_B</i> ⁻ <i>m_B</i> ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3) <i>pRARE2</i> , <i>Cm_r</i>	(Hanahan, 1983)

3.1.2 Nährmedien

NZA Medium

10g NZ-Amin

5g Hefe-Extrakt

5g NaCl

NZA-Agar

15g Agar

ad 1L NZA-Medium

3.1.3 Antibiotika

Tab. 3-2: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Konzentration (μ g/ml)
Ampicillin	100
Chloramphenicol	25

3.1.4 Eukaryotische Zelllinien

Tab. 3-3: Verwendete eukaryotische Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft
HCT116	Humane epitheliale Kolorektalkarzinomzelllinie, adhären	ATCC/LGC
HCT116 shMBD2-1	HCT116 mit lentiviralem Expressionsvektor, der für eine shRNA gegen MBD2 codiert	AG Ehrmann, Dr. I. Irle Laborbestand
HCT116 shMBD2-2	HCT116 mit lentiviralem Expressionsvektor, der für eine shRNA gegen MBD2 codiert	
HCT116 Leervektor	HCT116 mit lentiviralem Expressionsvektor	
SW480	Humane epitheliale Kolorektalkarzinomzelllinie, adhären	ATCC/LGC
Ma-Mel-012	Humane Melanommetastasenzelllinie, adhären	Prof. Dirk Schadendorf, Hautklinik, Universitätsklinikum Essen
Ma-Mel-037b	Humane Melanommetastasenzelllinie, adhären	
Ma-Mel-046	Humane Melanommetastasenzelllinie, adhären, BRAF V600E Mutation	
Ma-Mel-057	Humane Melanommetastasenzelllinie, adhären, BRAF V600E Mutation	
Ma-Mel-060	Humane Melanommetastasenzelllinie, adhären, NRAS Q61K Mutation	
Ma-Mel-063a	Humane Melanommetastasenzelllinie, adhären, BRAF V600E Mutation	
Ma-Mel-065	Humane Melanommetastasenzelllinie, adhären, NRAS Q61K Mutation	
Ma-Mel-066a	Humane Melanommetastasenzelllinie, adhären, BRAF V600E Mutation	
Ma-Mel-074	Humane Melanommetastasenzelllinie, adhären, NRAS Q61K Mutation	
Ma-Mel-103b	Humane Melanommetastasenzelllinie, adhären	
Ma-Mel-105	Humane Melanommetastasenzelllinie, adhären, NRAS Q61K Mutation	
Ma-Mel-107	Humane Melanommetastasenzelllinie, adhären	
Ma-Mel-123	Humane Melanommetastasenzelllinie, adhären	

3.1.5 Zellkulturmedium und Zusätze

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) für HCT116 und SW480 Zelllinien

Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI) für alle Melanom-Zelllinien

Trypsin/EDTA

Fötales Kälberserum (FCS)

Penicillin/Streptomycin (10000 Units/ml PenicillinG, 10000µg/ml Streptomycinsulfat)

Geneticin G-418 Sulfat (50 mg/ml)

Alle Zellkulturmedien und Zusätze wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

3.1.6 Antikörper und Farbstoffe

Tab. 3-4: Verwendete Primärantikörper

Antikörper	Organismus	Herkunft
α- HTRA1	Kaninchen	AG Ehrmann, Laborbestand
α -BRAF (F7)	Maus	Santa Cruz (Heidelberg), #sc-5284
α -BRAF V600E	Maus	Spring Bioscience (Pleasanton, USA), #E19290
α -CRAF	Kaninchen	Cell Signaling (Leiden, NL), #9422
α- NRAS (F155)	Maus	Santa Cruz (Heidelberg), #sc-31
α- pan-RAS	Maus	Millipore (Schwalbach), #05-516
α- ERK	Kaninchen	Cell Signaling (Leiden, NL), #9102
α- phospho ERK	Kaninchen	Cell Signaling (Leiden, NL), #4376
α- MEK	Kaninchen	Cell Signaling (Leiden, NL), #9126
α- phospho MEK	Kaninchen	Cell Signaling (Leiden, NL), #9154
α- Tubulin (D-10)	Maus	Santa Cruz (Heidelberg), #sc-5274

Tab. 3-5: Verwendete Sekundärantikörper und Farbstoffe

<i>Antikörper</i>	<i>Detektion</i>	<i>Herkunft</i>
α- Maus	ECL	GE Healthcare
α- Maus	Alkalische Phosphatase	Sigma-Aldrich (München), #A1418
α- Kaninchen	Alkalische Phosphatase	Dako (Hamburg), #D0487
α- Kaninchen Konformationsspez.	ECL	Cell Signaling (Leiden, NL), #5127
α- Kaninchen-488	Fluoreszenz	Invitrogen (Karlsruhe), #A21206
α- Maus-633	Fluoreszenz	Invitrogen (Karlsruhe), #A21052
DAPI	Fluoreszenz	Invitrogen (Karlsruhe)

Tab. 3-6: Verwendete Antikörper für ChIP

<i>Antikörper</i>	<i>Organismus</i>	<i>Herkunft</i>
α- MBD2	Kaninchen	Sigma-Aldrich (München), #M7318
α- H3K9ac	Kaninchen	Diagenode (Liege,Belgien), #pAB-177-050
α- Histone3	Kaninchen	Abcam (Cambridge, England), #1791
α- RNAPolymeraseII	Maus	Active Motif (La Hulpe, Belgien), #101307
α- IgG	Maus	Active Motif (La Hulpe, Belgien), #101226

3.1.7 Biochemikalien und Chemikalien

3.1.7.1 Chemikalien

Die für die Puffer und Lösungen verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (München), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Roth (Karlsruhe) und Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

3.1.7.2 Enzyme

Tab. 3-7: Verwendete Enzyme

<i>Enzym</i>	<i>Herkunft</i>
Restriktionsenzyme	NEB, Ipswich, MA, USA
DNase	Macherey und Nagel (Düren)
RNase	Sigma-Aldrich (München)
Proteinase K	Sigma-Aldrich (München)
Hot Star Taq-Polymerase	Qiagen (Hilden)
Phusion Polymerase	NEB, Ipswich, MA, USA

3.1.7.3 Synthetische Peptide

Tab. 3-8: Verwendete synthetische Peptide

<i>Peptid</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Molekulargewicht in Da</i>
Human BRAF (C-Terminus)	QAGGYGAFPVH	1103,2
Human CRAF (C-Terminus)	TLTTSPRLPVF	1231,46

Alle Peptide wurden in DMSO gelöst.

3.1.7.4 Protein- und Nukleinsäurestandards

Tab. 3-9: Verwendete Protein- und Nukleinsäurestandards

<i>Standard</i>	<i>Herkunft</i>
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma-Aldrich (München)
Prestained SDS-PAGE Standard	Bio-Rad (München)
Unstained SDS-PAGE Standard	Bio-Rad (München)
Quick-Load-2-log DNA Ladder	NEB, Ipswich, MA, USA

3.1.8 Vektoren und Plasmide

Tab. 3-10: Verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
pGEX2T-CRAF-RBD	GST-fusionierte Ras-Bindedomäne (RBD) von CRAF	Prof. Wittinghofer, MPI Dortmund
pGEX4T3-BRAF-433-765	GST-fusionierte Kinasedomäne von BRAF	Prof. Wittinghofer, MPI Dortmund
pGEX2T	GST-Konstrukt	Laborbestand
pCMV HTRA1-myc-FLAG	Humanes HTRA1 fusioniert mit myc- und FLAG-Tag	Jeremy Chien, USA
pCR2.1-TOPO	Klonierungsvektor	Invitrogen (Karlsruhe)

3.1.9 Komplettsysteme

Tab. 3-11: Verwendete Komplettsysteme

Komplettsystem	Hersteller
EpiTEct Bisulfite Kit	Qiagen (Hilden)
MiniElute PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
NucleoBond® Xtra Midi (EF)	Macherey-Nagel (Düren)
Nucleospin RNA II	Macherey-Nagel (Düren)
PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
TOPO TA Cloning	Invitrogen (Karlsruhe)
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen (Hilden)
QPCR SYBR Green Mix	Thermo Scientific, Waltham MA, USA
Verso cDNA Kit	Thermo Scientific, Waltham MA, USA

3.1.10 Oligonukleotide

3.1.10.1 Oligonukleotide für BRAF- und NRAS-Genotypisierung

Tab. 3-12: Verwendete Oligonukleotide für die BRAF-und NRAS Genotypisierung

Name	Nukleotidsequenz (5'-3')
BRAF-E15-W-1-5	CATAATGCTTGCTGTGATAGG
BRAF-E15-W-1-3	GGCCAAAAATTTAATCAGTGA
NRAS-E2-W-1-5	CCCCCTTACCCTCCACACC
NRAS-E2-W-1-3	GAGGTTAATATCCGCAAATGACTT

3.1.10.2 Oligonukleotide für qPCR

Tab. 3-13: Verwendete qPCR-Oligonukleotide

Name	Nukleotidsequenz (5'-3')
human <i>HTRA1</i> forward	GCAACTCAGACATGGACTACATC
human <i>HTRA1</i> reverse	GTGTTAATTCCAATCACTTCACCG
human <i>MBD2</i> forward	AACCCTGCTGTTTGGCTTAAC
human <i>MBD2</i> reverse	CGTACTTGCXTGTACTCGCTCTTC
human <i>BRAF</i> forward	GTGGATTATGCTCCCCACC
human <i>BRAF</i> reverse	CTGCCATTCCGGAGGAG
human <i>NRAS</i> forward	GCACCATAGGTACATCATCCG
human <i>NRAS</i> reverse	GCTTCCTCTGTGTATTTGCCA
human <i>GAPDH</i> forward	GCTTGTCATCAATGGAAATCCC
human <i>GAPDH</i> reverse	AGCCTTCTCCATGGTGG
human <i>RibProtL13A</i> forward	GGTGGTCGTACGCTGTG
human <i>RibProtL13A</i> reverse	GTCCGCCAGAAGATGC

3.1.10.3 Oligonukleotide für Bisulfit-Sequenzierung-PCR (BSP)

Tab. 3-14: Verwendete Oligonukleotide für BSP

<i>Name</i>	<i>Nukleotidsequenz (5'-3')</i>
human HTRA1_BSP_259_forward	TGTAGTGYGTGGTGTTTTT
human HTRA1_BSP_259_reverse	AAATTACCCTAACCACCCC
human HTRA1_BSP_-462_forward	GATTTGTAGGAATTTTTTYYGG
human HTRA1_BSP_-462_forward	ACCCAACCCATTAACCTC
human HTRA2_BSP_299_forward	TGAGGGAAGTTTTATAATTGTTGT
human HTRA2_BSP_299_reverse	ATACCTAAAATCCTTCAAAAATACAC
human HTRA2_BSP_-368_forward	GGATATAGGAGGTGGTGATTG
human HTRA2_BSP_-368_reverse	AATCCACRTCTTCCTAATCAACTA
human HTRA3_BSP_161_forward	GGGTTTTTATTAGAAAGGATTTTTG
human HTRA3_BSP_161_reverse	AAACCAACTCCCTCCAACC
human HTRA3_BSP_-455_forward	ATTTTTGTAATTGTTGTTTGGTG
human HTRA3_BSP_-455_reverse	AAAAAACTTCACTTCCTCCCTAAC

3.1.10.4 Oligonukleotide für ChIP-qPCR

Tab. 3-15: Verwendete Oligonukleotide für ChIP-qPCR

<i>Name</i>	<i>Nukleotidsequenz (5'-3')</i>
human HTRA1_ChIP_825_forward	TTCAGGACTGGGAATTGGCG
human HTRA1_ChIP_825_reverse	GGTCCCGTGATCAAAGCAGTG
human HTRA1_ChIP_1604_forward	ACGGGAAGATGCCAGAGCC
human HTRA1_ChIP_1604_reverse	CCGAGGGCTGTGCTCCTG
human HTRA1_ChIP_-453_forward	GAACTTTCCCCGGCGC
human HTRA1_ChIP_-453_reverse	GCGCCCCACATATTCGC
human HTRA1_ChIP_-785_forward	CTCTCTGCGAATACGGACAC
human HTRA1_ChIP_-785_reverse	CCAGACCCACAGTGAAGTGAT
human GAPDH-2_ChIP_primerset	Active Motif #71006

3.1.11 Verbrauchsmaterialien

Centricon PES 10 und 50 kDa	Sartorius Stedium, Göttingen
CryoTube Vials	Roth, Karlsruhe
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
PD-10 Säulchen	GE Helthcare, Buckinghamshire, UK
PVDF Membran	GE Helthcare, Buckinghamshire, UK
Röntgenfilme	GE Helthcare, Buckinghamshire, UK
Sterilfilter 0,45 µm	PALL, East Hills, NY, USA
Zellkulturschalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen

3.1.12 Geräte

Absaugpumpe Typ N811KN.18	KNF Neuberger, Freiburg
Autoklav	BeliMed, Mühlheim am Inn
Bioruptor (Ultraschallgerät)	Diagenode, Liege, Belgien
CO ₂ -Inkubator HEPA Class 100	Thermo Scientific, Waltham MA, USA
Durchflusszytometer FACScalibur	BD Biosciences, Heidelberg
Elektrophoreseapparatur	Bio-Rad, München
Entwicklungsmaschine	Cawo, Schrobenhausen
French Press	Thermo Scientific, Waltham MA, USA
Horizontalschüttler	Grant Böckler, Cambridge, GB
Konfokales Mikroskop (TCS-SP5)	Leica Microsystems, Wetzlar
Neubauerzählkammer	Hecht-Assistent, Sondheim
NanoDrop 1000	Thermo Scientific, Waltham MA, USA
PCR-Gerät Thermocycler Personal	Biometra, Göttingen

pH-Meter	Schott, Mainz
qRT-PCR Gerät Rotor-Gene 3000	Corbett Research, Cambridge, GB
Rotoren: JA25.50 und JLA9.100	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld
Sicherheitswerkbank HERA safe, HS12	Heraeus, Hanau
Spectrometer Genios Pro	Tecan, Crailsheim
Standzentrifuge Avanti J-E	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Thermovac	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld
Zetasizer nano	Malvern Instruments, Herrenberg

Alle nicht aufgeführten Geräte entsprechen den üblichen Laborstandards.

3.1.13 Software

<i>BIQAnalyzer</i>	(Bock et al., 2005)
<i>EMBOSS Cpgplot</i>	ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_cpgplot
<i>FlowJo</i>	
<i>GraphPad Prism 6 Demo</i>	graphpad.com/demos/
<i>ImageJ</i>	rsbweb.nih.gov/ij/index.htm
<i>Leica Software</i>	Leica Microsystems, Wetzlar
<i>MethPrimer</i>	(Li and Dahiya, 2002)
<i>Office 2008</i>	Microsoft Corporation, Redmond, USA
<i>Primer Blast</i>	ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/
<i>RotorGene</i>	Corbett Research, Qiagen, Hilden
<i>Serial Cloner</i>	

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Damit Bakterien Plasmid-DNA in ausreichendem Maß aufnehmen können, müssen diese kompetent gemacht werden (Methode modifiziert nach Chung *et al.*, 1989). Dazu wurden 5 ml NZA-Medium mit einem Einzelklon beimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 50 ml NZA-Medium mit der Vorkultur beimpft, sodass eine OD₆₀₀ von 0,1 erreicht wurde. Die Zellen wurden bei 37°C auf einem Schüttler, bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert, damit die Bakterien die log-Wachstumsphase erreichen. Anschließend wurde die Kultur für 10-15 min auf Eis abgekühlt. Danach wurden die Zellen bei 4°C für 15 min bei 4000 rpm pelletiert. Nach zweimaligem Waschen des Pellets mit 17 ml 10% Glycerin und mit 4 ml 10% Glycerin wurden die Zellen zu je 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C bis zur Transformation gelagert.

3.2.1.2 Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen

Als Transformation bezeichnet man die Aufnahme von Plasmid-DNA durch kompetente Bakterien.

Die chemisch kompetenten *E. coli* wurden schonend auf Eis aufgetaut. Die Bakterien wurden mit Plasmid-DNA versetzt und für 15 min auf Eis inkubiert. Es folgten der Hitzeschock bei 42°C für 1 min und eine Inkubation auf Eis für 5 min. Anschließend wurden 900 µl NZA-Medium zu den Bakterien gegeben und für 1 h bei 37°C und 300 rpm inkubiert.

100 µl des Ansatzes wurden auf eine Agar-Platte, die das dem Plasmid entsprechende Antibiotikum enthält, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Für eine anschließende Plasmid-Präparation (3.2.1.3 und 3.2.1.4) oder Reinigung von GST-Proteinen (3.2.3.6) wurden Einzelklone von dieser Agar-Platte verwendet.

3.2.1.3 Plasmid-Minipräparation

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte aus 5 ml *E. coli*-Flüssigkulturen, welche mit einem Einzelklon angeimpft wurden. Für die Plasmid-Präparation wurde das *QIAprep Spin Miniprep Kit* nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die Konzentration der isolierten Plasmid-DNA-Lösung wurde photometrisch bestimmt (3.2.1.6).

3.2.1.4 Plasmid-Midipräparation

Zur Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA wurde eine Maxipräparation durchgeführt. Hierfür wurden 400 ml NZA-Medium, welches das entsprechende Selektionsantibiotikum zugefügt wurde, mit einem Einzelklon angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Für die Plasmid-Präparation wurde das *NucleoBond Xtra Midi Kit* nach den Angaben des Herstellers verwendet. Für die Isolierung von Plasmid-DNA, welche für die Zellkultur vorgesehen war wurde das Endotoxin-freie *NucleoBond Xtra Midi EF Kit* verwendet. Die Konzentration der isolierten Plasmid-DNA-Lösung wurde photometrisch bestimmt (3.2.1.6).

3.2.1.5 Isolierung genomischer DNA

Zur Isolierung genomischer DNA aus humanen Zelllinien wurde das *QIAamp DNA Mini Kit* entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Die Konzentration der isolierten DNA wurde photometrisch bestimmt (3.2.1.6).

3.2.1.6 Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

Die Konzentration von DNA und RNA kann aus der Extinktion der Nukleinsäurelösung bei 260 nm, wo das Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren liegt (OD_{260}), berechnet werden. Das Lösungsmittel der Nukleinsäure dient dabei als Referenz. Eine Extinktion von 1 bei einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm entspricht einer Konzentration von 50 µg/µl doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/µl einzelsträngiger RNA. Der Quotient aus den Absorptionsmaxima bei 260 nm und 280 nm kann als Maß für die Qualität der Nukleinsäure herangezogen werden. Der Quotient liegt bei hochwertigen Nukleinsäuren zwischen 1,8 und 2,0.

Die photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte am *NanoDrop 1000*.

3.2.1.7 Bisulfit-Behandlung von DNA

Für die Untersuchung des Methylierungsstatus von DNA wird die zu untersuchende DNA mit Natriumbisulfit behandelt. Diese Behandlung induziert in einzelsträngiger DNA die hydrolytische Desaminierung von unmethyliertem Cytosin zu Uracil. Methylierte Cytosine werden durch die Behandlung nicht verändert. Unmethylierte und methylierte DNA unterscheiden sich dementsprechend nach der Bisulfit-Behandlung hinsichtlich ihrer Sequenz (Frommer *et al.* 1992). Der kritische Schritt für die korrekte Bestimmung des Methylierungsmuster ist die vollständige Konversion der unmethylierten Cytosine. Dafür ist eine Inkubation der DNA bei hohen Bisulfit-Salzkonzentrationen (2,5 – 3 M), hohen Temperaturen (60°C bis 99°C) und einen niedrigen pH-Wert (pH 5) erforderlich. Die Bisulfit-

behandelte DNA ist sehr anfällig für Degradation, sie wird daher bei -80°C aufbewahrt und es wird auf wiederholtes Auftauen und Einfrieren verzichtet.

Die Bisulfit-Behandlung erfolgte mit *dem EpiTect Bisulfite Kit* entsprechend den Angaben des Herstellers. In die Reaktion wurden 500 ng bis 2 µg genomische DNA (3.2.1.5) eingesetzt.

3.2.1.8 Bisulfit-Sequenzierungs-PCR (BSP)

Mit Hilfe der BSP und anschließender Sequenzierung kann Bisulfit-behandelte DNA hinsichtlich ihres Methylierungsmusters untersucht werden. Die PCR auf Bisulfit-behandelter DNA erfordert *Primer*, die Regionen überspannen, in denen kein Cytosin innerhalb eines Dinukleotids CpG vorhanden ist, um eine Amplifikation von methylierter und unmethylierter DNA zu ermöglichen. Weist die zu untersuchende Sequenz eine derart hohe Dichte des Dinukleotids CpG auf, dass es nicht möglich ist, einen ausreichend langen Primer zu gestalten ohne ein CpG zu überspannen, werden *Primer* mit degenerierten Basen verwendet. Außerdem ist bei der Gestaltung der *Primer* zu beachten, dass alle unmethylierten Cytosine nach der Bisulfit-Behandlung als Uracil vorliegen. Für die Erstellung der BSP-*Primer* wurde die Software *MethPrimer* verwendet. Hierbei findet eine virtuelle Konvertierung der ursprünglichen genomischen DNA in Bisulfit-behandelte DNA statt. Anhand dieser Sequenz werden die BSP-*Primer* nach den oben genannten Punkten entworfen.

Die PCR-Produkte wurden in einen TOPO TA-Vektor kloniert (3.2.1.9) und sequenziert (3.2.1.10), um methylierte und unmethylierte Cytosine in der ursprünglichen DNA-Sequenz zu identifizieren. Die Klonierung des PCR-Produkts und anschließende Sequenzierung eines Einzelklons liefert das Methylierungsmuster eines individuellen DNA-Moleküls. In der Sequenz erscheinen unmethylierte Cytosine als Thymin auf dem codierenden Strang und als Adenin auf dem nicht-codierenden Strang. Für die Analyse des Methylierungsmusters wurde das *BIQAnalyzer* verwendet.

Für die BSP wurde folgender Ansatz verwendet:

Tab. 3-16: Ansatz für eine BSP

Komponente	Volumen (µl)
10 x Puffer	5
Q-Solution	5
dNTP (jeweils 10 mM)	1
Primer forward (10 µM)	2,5
Primer reverse (10 µM)	2,5
Taq-Polymerase	0,25
genomische DNA	0,5 -2 µg
H2O	add 50

Für die Amplifikation von Bereichen innerhalb des humanen *HTRA1*-Promoters wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

1. 95°C	15 min		
2. 94°C	1 min	}	40 Zyklen
3. 60°C	1 min		
4. 68°C	1min		
5. 68°C	10 min		

Für die Amplifikation von Bereichen innerhalb der humanen *HTRA2*- und *HTRA3*-Promoter wurde folgendes *Touchdown* PCR-Programm verwendet:

1. 95°C	15 min		
2. 94°C	1 min		
3. 60 - 56°C	je 1°C 1 min		
4. 72°C	1min		
5. 94°C	1 min	}	35 Zyklen
6. 56°C	1 min		
7. 72°C	1 min		
8. 72°C	10 min		

Die PCR-Produkte wurden in den pCR2.1-TOPO-Vektor kloniert (3.2.1.9).

3.2.1.9 TOPO TA- Klonierung

Die TOPO TA-Klonierung ist eine hocheffiziente, einstufige Klonierungsstrategie, die das direkte Einbringen eines *Taq*-Polymerase-amplifizierten PCR-Produkts in den bereits linearisierten pCR2.1-TOPO-Vektor ermöglicht. Das *TOPO TA Cloning-Kit* wurde

entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Der komplette Ansatz wurde auf eine ampicillinhaltige NZA-Agar-Platte ausgestrichen und über Nacht inkubiert. Bis zu 20 Einzelklone wurden in eine NZA-Flüssigkultur überimpft und anschließend die Plasmid-DNA isoliert (3.2.1.3).

3.2.1.10 Genotypisierungs-PCR

Für die Genotypisierung der Melanom-Zelllinien wurde eine Genotypisierungs-PCR durchgeführt. Die Mutation NRAS Q61K befindet sich im zweiten Exon, die Mutation BRAF V600E befindet sich in Exon 15. Diese beiden Regionen wurden jeweils aus genomischer DNA amplifiziert (3.2.1.5) und das PCR-Produkt sequenziert (3.2.1.11). Die PCR-Reaktionsansätze wurden nach folgendem Pipettierschema angesetzt:

Tab. 3-17: Pipettierschema für die Genotypisierungs-PCR

<i>Komponente</i>	<i>Volumen (µl)</i>
Phusion buffer GC	4
Phusion Polymerase	0,2
Primer forward (10 µM)	1
Primer reverse (10 µM)	1
genomische DNA 10ng/µl	2
H2O	add 20

Die Genotypisierungs-PCR erfolgte am PCR-Gerät nach folgendem Programm:

1. 98°C	1 min	} 35 Zyklen
2. 98°C	15 s	
3. 55°C für <i>BRAF</i>	20 s	
60°C für <i>NRAS</i>		
4. 72°C	15 s	}
5. 72°C	10 min	

Mit Hilfe des *PCR Purification Kit* wurden Salze und Primer entfernt und die PCR-Produkte in Wasser eluiert.

3.2.1.11 Sequenzierung

Die Sequenzierung von rekombinanten Plasmiden, genomisch amplifizierter DNA und der PCR-Produkte der BSP wurde bei der Firma GATC Biotech (Konstanz) durchgeführt.

3.2.2 Zellbiologische Methoden

Alle Zellkulturarbeiten wurden mit sterilen Lösungen und Geräten in der Sterilbank durchgeführt. Die Zelllinien wurden bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂ im Inkubator kultiviert und in regelmäßigen Abständen auf Mycoplasmen-Infektion getestet.

Tab. 3-18: Kulturbedingungen der häufig verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Medium	Passage	Verdünnung
HCT116	DMEM, 10%FCS, 1% Pen./Strep.	2-3 Tage	1:10
SW480	DMEM, 10%FCS, 1% Pen./Strep.	3-4 Tage	1:5
Ma-Mel 60-1	RPMI, 10%FCS, 1% Pen./Strep.	wöchentlich	1:20
Ma-Mel 60-2	RPMI, 10%FCS, 1% Pen./Strep.	wöchentlich	1:10
Ma-Mel 60-3	RPMI, 10%FCS, 1% Pen./Strep.	wöchentlich	1:8
Ma-Mel 60-9	RPMI, 10%FCS, 1% Pen./Strep.	wöchentlich	1:8
Ma-Mel 66-5	RPMI, 10%FCS, 1% Pen./Strep.	wöchentlich	1:10
Ma-Mel 66-6	RPMI, 10%FCS, 1% Pen./Strep.	wöchentlich	1:3

3.2.2.1 Auftauen von Zellen

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Kryokulturen wurden auf Eis transportiert und zügig unter Schwenken im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Die Zellsuspension wurde zunächst in 2 ml Medium aufgenommen, um einen osmotischen Schock zu verhindern. Nach etwa 1 min wurden weitere 5 ml Medium zugegeben und die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert (1000 rpm, 5 min, RT). Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, das Zellsediment mit PBS gewaschen, um Reste von DMSO zu entfernen, und nochmals zentrifugiert. Das Zellsediment wurde dann in 10 ml Medium resuspendiert und auf eine 10 cm Gewebekulturschale überführt. Zur Entfernung evtl. abgestorbener Zellen wurde nach 24 h das Medium von den Zellen abgesaugt und erneuert.

3.2.2.2 Passagieren von Zellen

Die kultivierten Zellen wurden bei einer Konfluenz von etwa 70-100% passagiert. Dazu wurden die Zellen nach Absaugen des Mediums mit PBS gewaschen. Das Ablösen der Zellen von der Schale erfolgte durch die Zugabe von 1 - 1,5 ml Trypsin/EDTA und anschließender Inkubation im Brutschrank für 5 -10 min. Das Ablösen der Zellen wurde mikroskopisch überprüft. Der Zell-/Trypsinsuspension wurde 9 ml Medium zugegeben, um

das Trypsin zu inaktivieren. Ausgehend von dieser Zell-Lösung wurden entsprechende Verdünnungen auf neue Kulturschalen ausgesät.

3.2.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Dazu wurde ein Deckgläschen auf der Zählkammer positioniert und 8 µl der Zellsuspension unter das Deckgläschen pipettiert. Die Kapillarkräfte sorgen für eine homogene Verteilung der Zellsuspension in der Zählkammer. Die Zellen in den vier äußeren der insgesamt neun großen Quadrate der Zählkammer wurden ausgezählt. Aus der Multiplikation des Mittelwerts mit dem Faktor 10^4 ergibt sich dann die Zellzahl pro Milliliter.

3.2.2.4 Kryokonservierung von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen trypsiniert (3.2.2.2) und zentrifugiert (1000 rpm, 5 min, RT). Die sedimentierten Zellen wurden in antibiotikafreiem Medium mit 25% FCS resuspendiert. Anschließend wurde dasselbe Volumen an Medium mit 10% DMSO dazu getropft und jeweils in 1 ml Aliquots in die Kryoröhrchen überführt. Nach schrittweisem Abkühlen der Zellen auf -80°C in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox, wurden die Zellen zur langfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

3.2.2.5 Transiente Transfektion von Plasmid-DNA in Melanoma-Zellen

Die Überexpression von HTRA1 wurde mittels einer transienten Transfektion erreicht. Das verwendete Plasmid besitzt u.a. einen CMV-Promoter, sodass nach erfolgreicher Transfektion eine konstitutive Genexpression in den Zellen erfolgt.

Die transiente Transfektion erfolgte mit Hilfe von kationischen Lipiden (Lipofectamine 2000 (Invitrogen)). Diese binden an die negativ geladene DNA und können nach Inkubation als Liposomen-DNA-Komplexe mit der Plasmamembran der Zelle fusionieren.

Die Zellen wurden ihren Wachstumseigenschaften entsprechend in 6-cm Zellkulturschalen ausgesät, sodass sie zur Transfektion etwa 80% konfluent waren. Das Medium wurde nach einem Waschschrift mit PBS durch antibiotikafreies Medium ersetzt. Der Liposomen-DNA-Komplex wurde anschließend in zusatzfreiem Medium vermengt. Hierzu wurden je 6-cm Zellkulturschale 150 µl Medium mit 9 µl Lipofectamine 2000 versetzt und 150 µl Medium mit Plasmid-DNA versetzt, sodass eine DNA-Konzentration von 20 ng/µl vorlag. Die Lösungen wurden vermischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden langsam 250 µl auf die Zellen getropft und leicht geschwenkt, sodass die Zellen mit einer DNA-Gesamtkonzentration von 2,5 µg behandelt wurden. Um die Effizienz der Transfektion

zu überprüfen wurde eine 6-cm Zellkulturschale mit einem GFP-fusionierten Plasmid behandelt und die GFP-Expression mikroskopisch verfolgt. Dementsprechend wurden die Zellen 48 h inkubiert bevor sie für weitere Versuche verwendet worden sind.

3.2.2.6 IGF-Behandlung der Melanomzellen

Die Stimulierung des ERK-Signalweges in den Melanomzellen erfolgte mittels humanem IGF (cell signaling, # 8917). Anschließend erfolgte die Immundetektion (3.2.3.5) von phosphoryliertem MEK und ERK, welche die Aktivität des Signalweges widerspiegeln.

Zu diesem Zweck wurden die Zellen in 6-cm Zellkulturschalen mit 10% FCS-haltigen Medium ausgesät. 24 h später wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann für 24 h in FCS-freiem Medium kultiviert, sodass durch die fehlenden Wachstumsfaktoren keine Aktivierung des ERK-Signalweges erfolgt. Die Reaktivierung erfolgte dann nach 24 h durch die Zugabe von 50 bzw. 100 ng/ml humanem IGF. Die Zellen wurden nach jeweils 10 und 30 min lysiert (3.2.3.1) und das lösliche Proteinextrakt über Immundetektion analysiert (3.2.3.5).

3.2.2.7 PLX4032-Behandlung der Melanomzellen

Die Hemmung der BRAF V600E-mutierten Kinase erfolgte über PLX4032 (zur Verfügung gestellt durch A. Sucker, Hautklinik, Universitätsklinikum Essen). Anschließend erfolgte die Immundetektion (3.2.3.5) von phosphoryliertem MEK und ERK, welche die Aktivität des Signalweges widerspiegeln.

Zu diesem Zweck wurden die Zellen in 6-cm Zellkulturschalen mit 10% FCS-haltigen Medium ausgesät und für 24 h kultiviert. Es folgte die Zugabe von unterschiedlichen Konzentrationen an PLX4032 (0.1, 1.0 und 10 μ M), der Kontrolle wurde das entsprechende Volumen an DMSO zugegeben. Die Zellen wurden nach 2,5 bzw. 4,5 h lysiert (3.2.3.1) und das lösliche Proteinextrakt über Immundetektion analysiert (3.2.3.5).

3.2.2.8 Zellsynchronisation mittels Serumentzug

Um die Funktion von HTRA1 in Abhängigkeit vom Zellzyklus zu analysieren wurden die zu untersuchten Zellen zunächst mittels Serumentzug synchronisiert. Zur Proliferation benötigen die Zellen Wachstumsfaktoren, die den Zellen über das FCS zur Verfügung gestellt werden. Der Entzug von FCS führt dazu, dass die Zellen in einen Ruhestand übergehen, die sog. Go-Phase. Durch die erneute Zugabe von FCS wird der synchrone Wiedereintritt in die G1-Phase induziert.

Zu diesem Zweck wurden die Zellen in 6-cm Zellkulturschalen mit 10% FCS-haltigen Medium ausgesät. 24 h später wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann für 40 h in FCS-freiem Medium kultiviert. Um den Wiedereintritt in die G1-Phase zu induzieren wurde anschließend das Medium durch 10% FCS-haltiges Medium ersetzt und die Zellen nach unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet.

3.2.2.9 Zellzyklusanalyse am Durchflusszytometer (FACS)

Die Messungen wurden am Durchflusszytometer FACScalibur durchgeführt. Für die Auswertung wurde das Programm *FlowJo* verwendet.

Mithilfe der FACS-Analyse kann die Verteilung der Zellen einer Population in den verschiedenen Zellzyklusphasen bestimmt werden. Die FACS-Messung ist eine Analyse von Einzelzellen, die auf den Streueigenschaften (Größe und Granularität) der Zellen und der Messung des DNA-Gehaltes in der Zelle beruht. Dazu wurden die Zellen mit Propidiumiodid angefärbt.

Nach dem trypsinieren (3.2.2.2) und Ernten der Zellen wurde das Zellsediment mit PBS gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgte durch 70% igen Ethanol p.a. bei 4°C für mindestens 1 Stunde. Anschließend wurden die Zellen nach dreimaligen Waschen mit PBS und zentrifugieren (500g, 5 min, 4°C) in 400 µl Propidiumiodidlösung resuspendiert und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Darauf erfolgte die Messung am Durchflusszytometer.

Propidiumiodidlösung

20 µg/ml Propidiumiodid

0,2 mg/ml RNase

3.2.2.10 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Zur Analyse der Bindung von MBD2 an den *HTRA1*-Promoter wurde die Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) mit anschließender qPCR zur Auswertung der *in vivo* gebundenen DNA-Fragmente in dieser Arbeit etabliert.

Zuerst wurde die DNA der Zellen mittels Sonifizierung fragmentiert, sodass DNA-Fragmente von einer Länge zwischen 200 und 500 bp vorlagen. Hierzu wurden die Zellen trypsinisiert, gezählt, zentrifugiert (1000 rpm, 5 min, 4°C) und mit PBS gewaschen. Je Zelllinie wurden 1×10^7 Zellen mit 1% Formaldehyd in 9 ml Medium für 10 min bei RT fixiert. Um weitere Protein-DNA Vernetzungen zu unterbinden wurde 1 ml Glycin (1,25 M) hinzugefügt und für weitere 5 min inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das Zellsediment mit PBS gewaschen und entweder bei -80°C gelagert oder direkt weiter verwendet. Die fixierten

Zellen wurden in 1 ml Lysepuffer resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach mehrmaligen vortexen wurden die Zellen zentrifugiert (5000 rpm, 5 min, 4°C), der Überstand verworfen, das Zellsediment mit 1 ml Lysepuffer gewaschen und in 500 µl Nukleus Lysepuffer resuspendiert. Nach einer 10 minütigen Inkubation auf Eis und mehrmaligen vortexen wurden die lysierten Zellkerne in einem eiskalten Wasserbad sonifiziert (30 Zyklen je 1 min Puls (*high*), 1 min Pause). Nach je 10 Zyklen wurde die Zellslösung für 30 sek gevortext, um eine ausreichende Vermengung zu gewährleisten. Anschließend wurde die Lösung zentrifugiert (14.000 rpm, 15 min, 4°C) und der Überstand für die folgende Immunopräzipitation verwendet oder bei -80°C gelagert.

Je Ansatz wurden 27,5 µg fragmentierte Chromatin-Lösung eingesetzt und mit Verdünnungspuffer 10fach auf 1 ml verdünnt, hiervon wurden 100 µl abgenommen und als Input-Kontrolle bei 4°C gelagert. Zur Vorreinigung wurde die Chromatin-Lösung mit 20 µl magnetischen ChIP-Protein A/G Beads (Millipore) für 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde der Überstand mit 2 µg (H3, H3K9ac, RNA Polymerase II, IgG) bzw. 10 µg (MBD2) des jeweiligen Antikörpers über Nacht bei 4°C inkubiert. Das Antikörper-Protein-DNA Gemisch wurde dann durch die Zugabe von 20 µl magnetischen ChIP-ProteinA/G Beads präzipitiert (4 h, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und die Beads je zweimal für 10 min mit Waschpuffer 1, Waschpuffer 2 und LiCl Waschpuffer gewaschen. Abschließend wurden die Beads zweimal mit TE-Puffer gewaschen bevor sie dann in 150 µl Elutionspuffer aufgenommen wurden (700 rpm, 15 min, 65°C). Der Elutionsschritt wurde zweimal durchgeführt, sodass ein Volumen von 300 µl vorlag. Die Protein-DNA Vernetzungen wurden dann durch die Zugabe von 200 mM NaCl und Inkubation bei 65°C über Nacht im Wasserbad gelöst. Ab diesem Schritt wurde auch die Input-Kontrolle wieder mitgeführt. Darauf folgte die Zugabe von 0,5 mg/ml Proteinase K (1 h, 55°C) und 3 µg RNase (30 min, 55°C). Schließlich wurde die DNA mittels dem *MiniElute PCR Purification Kit* nach Angaben des Herstellers eluiert. Es erfolgten zwei Elutionsschritte mit je 9 µl H₂O. Die gereinigte DNA wurde für die folgende qPCR-Analyse verwendet.

Lysepuffer

20 mM Tris HCl pH 8,0
85 mM KCl
0.5% NP-40

Verdünnungspuffer

20 mM Tris HCl pH 8,0
150 mM NaCl
2 mM EDTA
1% Triton X-100

Waschpuffer 2

20 mM Tris HCl pH 8,0
500 mM NaCl
2 mM EDTA
1% Triton X-100

TE Puffer

10 mM Tris HCl pH 8,0
1 mM EDTA

Nukleus Lysepuffer

50 mM tris HCl pH 8,0
10 mM EDTA
1% SDS

Waschpuffer 1

20 mM Tris HCl pH 8,0
150 mM NaCl
2 mM EDTA
1% Triton X-100
0,1% SDS

LiCl Waschpuffer

20 mM Tris HCl pH 8,0
250 mM LiCl
1 mM EDTA
1% NP-40

Alle Puffer wurden frisch mit Protease-Inhibitor und 5 mM TSA angesetzt und bei 4°C gelagert.

Elutionspuffer

1% SDS
100 mM NaHCO₃

3.2.2.11 ChIP-qPCR-Reaktion und ChIP-Quantifizierung

Die DNA-Fragmente, die mit Hilfe der ChIP gewonnen wurden, wurden auf das Vorhandensein von *HTRA1*-Promotersequenzabschnitten mittels qPCR (3.2.2.18) analysiert. Als Kontrollregion diente ein Abschnitt des *GAPDH*-Gens. Folgendes Pipettierschema wurde je *Primer* im Duplikat angesetzt:

Tab. 3-19: Pipettierschema für eine ChIP-qPCR-Reaktion

Komponente	Volumen (µl)	Molarität (mM)
SYBR Green Mix	12,5	150 - 300
Primer forward (10 µM)		
Primer reverse (10 µM)		
ChIP-DNA	1,5	150 - 300
H2O	add 25	

Die *Primer* wurden in unterschiedlichen Konzentrationen hinzugegeben und die zur Analyse verwendeten C(T)-Werte wurden bei unterschiedlichen Temperaturen ausgelesen:

Tab. 3-20: Konzentration und Auslesetemperaturen der ChIP-qPCR *Primer*

Primer	Molarität (mM)	Auslesetemperatur (°C)
825	150	80
1604	150	80
-453	300	84
-785	150	80
GAPDH	lt.Kit	84

Die ChIP-qPCR-Reaktion erfolgte am *Rotor Gene3000* nach folgendem PCR-Programm:

6. 95°C	15 min	}	45 Zyklen
7. 95°C	15 s		
8. 65 °C	30 s		
9. 72°C	30 s		
10. 80°C	15 s		
11. 84°C	15 s		
12. 40°C	120 s	}	Schmelzkurve
13. 50°C	60 s		
14. 50-99°C	je 1°C, 5 s		

Die quantitative Auswertung der C(T)-Werte erfolgte zunächst nach der %-Input Methode, um die unterschiedlichen Datensätze miteinander vergleichen zu können. Da die sog. Input-DNA nur 10% von der Gesamt-DNA betrug wurde der Input C(T)-Wert (CtInput) nach folgender Gleichung angepasst:

Formel 3-1

$$CtInput_{korrigiert} = CtInput - \frac{\log(10)}{\log(2)}$$

Die gemittelten C(T)-Werte der Immunpräzipitationen (CtIP) wurden dann zum korrigierten Input C(T)-Wert normalisiert. Dadurch wurde der Anteil berechnet, der prozentual gesehen von der Gesamt-DNA präzipitiert wurde.

Formel 3-2

$$\begin{aligned} \%Input &= 100 \cdot 2^{-\Delta Ct} \\ \Delta Ct &= CtIP - CtInput_{korrigiert} \end{aligned}$$

Um die unspezifische Bindung von α -MBD2 zu berücksichtigen, wurde der prozentuale Anteil, der aus dem Chromatin präzipitiert wurde und an den *HTRA1*-Promoter gebunden war, zum Anteil, der an den *GAPDH*-Bereich gebunden hat, relativiert. Der prozentuale Anteil von acetyliertem Lysin an Position 9 am Histon H3 wurde zum Gesamt-Anteil von präzipitiertem Histon H3 relativiert.

3.2.2.12 Immunpräzipitation von HTRA1 und BRAF

Um die Interaktion zwischen HTRA1 und RAF-Proteinen *in vivo* zu untersuchen wurden Immunpräzipitationen (IP) mit zytoplasmatischen Proteinextrakten durchgeführt. Die Präzipitation erfolgte an unbehandelten Zellen und der komplette Versuchsablauf fand im Kühlraum statt.

Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von etwa 80% kultiviert. Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 500 μ l Lysepuffer versetzt. Für die Präzipitation von endogenem BRAF wurde der Lysepuffer NP-40 verwendet, wohingegen endogenes HTRA1 in RIPA Lysepuffer präzipitiert wurde. Soweit sich die Zellen sich nicht selbst von der Schale abgelöst hatten wurden sie vorsichtig mit einem Gummi-Zellscharber abgekratzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Zelltrümmer wurden mittels Zentrifugation (14.000 rpm, 15 min, 4°C) entfernt. Von dem Überstand wurde die Proteinkonzentration (3.2.3.2) bestimmt und die Proteinlösung auf 1 μ g/ μ l mit dem jeweiligen Lysepuffer verdünnt. Zur Vorreinigung des Proteinlysates wurde der Überstand mit 40 μ l magnetischen Protein A/G Beads (Millipore) für eine Stunde inkubiert. Von diesem vorinkubierten Proteinlysate wurden 50 μ g als Input-Kontrolle abgenommen. Für die eigentliche Präzipitation wurden dann 500 μ g Proteinlysate je Antikörper (**Tab. 3-21**) eingesetzt.

Tab. 3-21: Verwendete Antikörper für Immunpräzipitation

Antikörper	Volumen (µl)
α-HTRA1	1
α-BRAF	5
α-IgG Maus	0,5
α-IgG Kaninchen	0,5

Die Antikörper-Proteinlysat Mischung würde über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Antikörper und die daran gebundenen Proteine durch die Zugabe von 50 µl magnetischen Protein A/G Beads präzipitiert. Nach 90 min wurde der Überstand mit Hilfe eines Magnets entfernt und die magnetischen Beads dreimal mit 1 ml Lysepuffer für 10 min gewaschen. Der letzte Waschschrift bestand aus 1 ml PBS/0,1% Tween, um Pufferreste zu entfernen. Zur Elution wurden die magnetischen Beads in 32 µl 2x SDS-Probenpuffer (100 mM DTT) resuspendiert und für 15 min bei 95°C inkubiert. Von dem Überstand wurden 25 µl auf ein SDS-Gel zur Immunodetektion aufgetragen.

Lysepuffer NP-40

50 mM Tris HCl pH 7,4
150 mM NaCl
5 mM EDTA
1% NP-40

Lysepuffer RIPA

50 mM Tris HCl pH 8,0
150 mM NaCl
0,5% Natriumdeoxycholat
1% NP-40
0,1% SDS

Die Lysepuffer wurden frisch mit Protease- und Phosphatase-Inhibitor angesetzt und bei 4°C gelagert.

3.2.2.13 *In vivo* GST-Pulldown Assay

Die gereinigten GST-fusionierten Proteine (3.2.3.6) wurden im GST-Pulldown Assay eingesetzt, um *in vivo* Interaktionspartner von HTRA1 zu bestimmen.

Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert. Für den Pulldown wurden unbehandelte oder transfizierte Zellen verwendet (3.2.2.5). Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 100 bzw. 500 µl Lysepuffer versetzt. Soweit sich die Zellen nicht selbst von der Schale abgelöst hatten wurden sie mit einem Gummi-Zellscharber abgekratzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Zelltrümmer wurden mittels Zentrifugation (14.000 rpm, 15 min, 4°C) entfernt und von dem Überstand wurde die Proteinkonzentration (3.2.3.2) bestimmt. Die Zellproteinlösung wurde auf 1 µg/µl verdünnt

und je Ansatz wurden 500 µl eingesetzt. Die Zellproteinlösung wurde mit den jeweiligen rekombinanten GST-fusionierten Proteinen inkubiert (90 min, 4°C). Die rekombinanten Proteine GST-CRAF-RBD (4 µl) und GST-BRAF-433-765 (50 µl) wurden zuvor an 50 µl GST-Agarose Beads (GE Healthcare) gebunden (1 h, 4°C). Die GST-Kontrolle lag bereits als GST-Agarose-gebundenes Protein vor. Der Inkubation folgte eine Zentrifugation (6000 g, 1 min, 4°C) und drei Waschschrte mit jeweils 1 ml Lysepuffer. Um möglichst alle Flüssigkeitsreste zu entfernen ohne das Pellet der Agarose Beads zu zerstören wurden Pipettenspitzen mit einer extrem flachen Spitzenöffnung verwendet, die keine Agarose Beads aufnehmen konnten. Die GST-Proteine und die daran gebundenen zytoplasmatischen Proteine wurden dann durch die Zugabe von 40 µl 2x SDS-Probenpuffer (200 mM DTT) für 10 min bei 95°C eluiert. Für die Analyse der gebundenen Proteine wurden 25 µl Eluat auf ein SDS-Gel aufgetragen (3.2.3.3 und 3.2.3.5).

Lysepuffer

25 mM Tris HCl pH 7,2

150 mM NaCl

5 mM MgCl₂

1% NP-40

1 mM DTT

Der Lysepuffer wurde frisch mit Protease Inhibitor angesetzt und bei 4°C gelagert.

3.2.2.14 Immunzytochemischer Nachweis von Proteinen in Zellen

Für die Herstellung von Präparaten für die mikroskopische Analyse von Zellen wurden diese auf sterilen Objektträgern ausgesät. Dazu wurden Objektträger in eine 6-Loch Zellkulturschale überführt, die Zellen darauf ausgesät und bis zur vollständigen Adhärenz inkubiert. Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen zweimal vorsichtig mit PBS gewaschen und durch Inkubation für 20 min in Methanol p.a. bei -20°C fixiert. Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen zur Permeabilisierung für 10 min mit 0,1% Triton-X 100 in PBS inkubiert und anschließend dreimal für 5 min mit PBS gewaschen. Um die unspezifische Bindung der Antikörper zu vermeiden, wurden die Zellen für 30 min mit 1% BSA in PBS inkubiert. Dann wurden die Objektträger in eine *wet chamber* überführt und für 1 h mit 80 µl der Erstantikörperlösung inkubiert. Nach drei Waschschrten mit PBS wurden 100 µl Zweitantikörperlösung, die auch Farbstoffe zur Färbung des Zellkerns enthielt, auf den Objektträger pipettiert und für 30 min inkubiert. In **Tab. 3-22** sind die Verdünnungen der verwendeten Erstantikörper und Farbstoffe angegeben.

Tab. 3-22: Verwendete Erstantikörper und Farbstoffe für die Immunfluoreszenz

<i>Antikörper</i>	<i>Verdünnung</i>
α -HTRA1	1:50
α -BRAF	1:50
α -NRAS	1:50
DAPI	1:10000

Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS und einmal mit Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen wurde ein Tropfen *ProLong Gold Antifade* auf den Objektträger gegeben und ein Deckglas möglichst luftblasenfrei darauf platziert. Zum Trocknen wurden die Präparate 24 h bei RT unter Lichtausschluss aufbewahrt, bevor sie bei 4°C langfristig gelagert wurden. Die Präparate wurden mit Hilfe eines Konfokal-Mikroskops (Leica TCS-SP5) analysiert (3.2.2.15).

3.2.2.15 Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie

Die konfokale Laser-Raster-Mikroskopie (LSCM, *Laser Scanning Confocal Microscopy*) zeichnet sich gegenüber der Durchlicht- und der Epifluoreszenzmikroskopie durch eine deutlich erhöhte optische Auflösung aus. Eine punktförmige Beleuchtung des markierten Bereiches und die Minimierung des Streulichtes führen zu einer hohen Schärfe des Bildes. Zum Einsatz kamen der Argon- und Krypton-Laser und ein 63x Öl-Objektiv. Die Proben wurden bei 488 und 633 nm angeregt.

3.2.2.16 RNA-Isolierung aus Zellen

Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen, bestehend aus Zelllyse, Homogenisierung, DNase Behandlung und Elution wurde das *Nucleospin RNA II Kit* nach den Angaben des Herstellers verwendet.

3.2.2.17 cDNA Synthese

Die isolierte RNA wurde zur Synthese von cDNA eingesetzt. Die cDNA-Synthese erfolgte mit Hilfe einer reversen Transkriptase und Oligo-(dT)-Primern, welche an den Poly(A)-Schwanz der mRNA binden. Für die cDNA-Synthese wurden 1 µg RNA eingesetzt und das *Verso cDNA Kit* nach Angaben des Herstellers verwendet. Der Reaktionsansatz wurde 1 h bei 46°C inkubiert.

3.2.2.18 Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

Die qPCR ist hochsensitiv und erlaubt quantitative Aussagen von sehr geringen Transkriptmengen und geringfügigen Veränderungen der Genexpression. Die Detektionsmethode basiert auf der Bindung des fluoreszenzmarkierten Farbstoffes *SYBR green* an doppelsträngige cDNA. Nach jedem Amplifikationszyklus kann so anhand der Fluoreszenz die Amplifikationsmenge bestimmt werden. Für die Quantifizierung wird die Expression des Zielgens relativ zur Expression von Referenzgenen ermittelt (Pfaffl et al., 2002). Als Referenzgene dienen nicht-regulierte Gene, die idealerweise eine stabile Expression zeigen und unabhängig von experimentellen Behandlungen sind. In dieser Arbeit wurden *GAPDH* und das *ribosomale Protein L13A (RibProtL13A)* als sog. *housekeeping genes* verwendet. Die relative Berechnung der Expression des Zielgens im Vergleich den Referenzgenen kompensiert Unterschiede in Qualität und Quantität der cDNA-Proben innerhalb eines Ansatzes.

Der Prozess der Normalisierung berücksichtigt die unterschiedlichen Effizienzen der PCR-Amplifikationen von Zielgen (E_{Ziel}) und Referenzgen (E_{Referenz}) und transformiert die logarithmischen Rohdaten in lineare Einheiten, welche die normalisierte Expression angeben. Die C(T)-Werte der Proben werden mit Hilfe des Programms *RotorGene* bestimmt. Dafür wird die logarithmische Darstellung der Fluoreszenzkurven ausgewählt, die durchschnittliche Hintergrundfluoreszenz der Zyklen zwei bis zehn subtrahiert und der Schwellenwert der Fluoreszenz auf 0,025 gesetzt. Der C(T)-Wert gibt den Zyklus an, an dem die Fluoreszenz in der Probe den Schwellenwert erreicht, wobei umso weniger Zyklen zum Erreichen des Schwellenwerts benötigt werden, je mehr Template-cDNA in der Probe am Anfang der QPCR-Reaktion vorhanden ist.

Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit Hilfe der *Software Q-Gene*. Zunächst wurde die normalisierte Expression (NE) einer Serie mit n Wiederholungen mit Hilfe der **Formel 3-3** durch n paarweise Vergleiche von CTReferenz mit einem CTZiel derselben Serie berechnet.

Formel 3-3

$$NE = \frac{(E_{\text{Referenz}})^{CT_{\text{Referenz}}}}{(E_{\text{Ziel}})^{CT_{\text{Ziel}}}}$$

Dann wurden die Mittelwerte und die Standardfehler für die Referenz und das Zielgen berechnet und die mittlere normalisierte Expression (MNE) über folgende Gleichung ermittelt:

Formel 3-4

$$MNE = \frac{(E_{Referenz})^{CT_{Referenz,Mittelwert}}}{(E_{Ziel})^{CT_{Ziel,Mittelwert}}}$$

Der Standardfehler der mittleren normalisierten Expression (SF_{MNE}) wird schließlich mit Hilfe der Gauss'schen Fehlerfortpflanzung berechnet:

Formel 3-5

$$SF_{MNE} = MNE \cdot ((\ln(E_{Ziel}) \cdot SE_{CT_{Ziel,Mittelwert}})^2 + (\ln(E_{Referenz}) \cdot SE_{CT_{Referenz,Mittelwert}})^2)^{\frac{1}{2}}$$

Mit Hilfe dieser Berechnungen wurden die Rohdaten der qPCR evaluiert und statistisch analysiert.

3.2.2.19 Bestimmung der Primer-Effizienz

Die Effizienz der entworfenen *Primer* wurde mit Hilfe eines Pools aus den hergestellten cDNA-Proben bestimmt. Verdünnungen von 10 ng bis zu 200 ng wurden jeweils in Dreifachbestimmung unter Verwendung der zu untersuchenden *Primer* in die Reaktion eingesetzt. Für die Auswertung wurde das Computerprogramm Microsoft Excel verwendet. Mit Hilfe des Programms wurden in einem Diagramm der Logarithmus der Konzentration auf der Abszisse und die C(T)-Werte auf der Ordinate aufgetragen. Die Steigung m der resultierenden Gerade wird über lineare Regression bestimmt. Mit Hilfe der Steigung m kann dann die Amplifikationseffizienz E mit Hilfe folgender Formel berechnet werden:

Formel 3-6

$$E = 10^{\frac{-1}{m}}$$

3.2.2.20 qPCR-Reaktion

Jede qPCR-Messung wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt. Außerdem wurde für jedes Primerpaar eine Wasserkontrolle mitgeführt. Die Ansätze der qPCR wurden nach folgendem Schema pipettiert:

Tab. 3-23: Pipettierschema für eine qPCR-Reaktion

Komponente	Volumen (µl)	Molarität (mM)
SYBR Green Mix	12,5	
Primer <i>forward</i> (10 µM)		150 - 250
Primer <i>reverse</i> (10 µM)		150 - 250
cDNA (10 ng/µl)	5	
H ₂ O	add 25	

Die qPCR-Reaktion erfolgte am *Rotor Gene3000* mit folgendem PCR-Programm:

15. 95°C	15 min		
16. 95°C	15 s	}	40 Zyklen
17. 63°C	30 s		
18. 72°C	30 s		
19. 80°C	15 s		
20. 84°C	15 s		
21. 40°C	120 s		
22. 50°C	60 s		
23. 50-99°C	je 1°C, 5 s		Schmelzkurve

Die *Primer* wurden in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt und die jeweiligen C(T)-Werte abhängig von der Schmelzkurve ausgelesen:

Tab. 3-24: Konzentration, Auslesetemperatur und Effizienz der verwendeten *Primer*

Primer	Molarität (mM)	Auslesetemperatur (°C)	Effizienz
<i>HTRA1</i>	250	80	1,88
<i>HTRA2</i>	250	84	1,93
<i>HTRA3</i>	250	84	2,05
<i>BRAF</i>	250	72	1,7
<i>NRAS</i>	250	72	1,88
<i>GAPDH</i>	150	84	1,98
<i>RibProtL 13A</i>	150	84	1,98

3.2.3 Proteinbiochemische Methoden

3.2.3.1 Herstellung zytoplasmatischer Proteinlysate

Zur Untersuchung der zellulären Proteinlevel mittels Immundetektion (3.2.3.5) wurden zytoplasmatische Proteinlysate hergestellt. Hierfür wurden die Zellkulturschalen mit eiskaltem PBS gewaschen, mit RIPA-Puffer (100-300 µl) versetzt und 5 min auf Eis inkubiert. Zur unterstützenden mechanischen Ablösung der Zellen wurde ein Gummi-Zellscharber verwendet. Die Zelllösung wurde zentrifugiert (14000 rpm, 15min, 4°C) und somit die Zelltrümmer vom proteinhaltigen Überstand getrennt. Die Proteinextrakte wurden direkt verwendet (zur Überprüfung der Phosphorylierung) oder bei -80°C gelagert.

RIPA-Lysepuffer

50 mM Tris HCl pH 8,0

150 mM NaCl

0,5% Natriumdeoxycholat

1% NP-40

0,1% SDS

1x Protease-Inhibitor

3.2.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinbestimmung der zellulären Proteinlysate (3.2.3.1) und der gereinigten rekombinanten Proteine (3.2.3.6) erfolgte nach Bradford (1976) unter Verwendung des Reagenz Roti-Nanoquant nach Angaben des Herstellers. Als Proteinstandard wurde eine BSA-Verdünnungsreihe hergestellt. Für die Auswertung wurde das Computerprogramm Microsoft Excel verwendet. Mit Hilfe des Programms wurden in einem Diagramm die BSA-Konzentration auf der Abszisse und die OD_{590}/OD_{450} -Werte auf der Ordinate aufgetragen. Mit Hilfe der resultierenden Geraden wurden die unbekannten Proteinkonzentrationen errechnet.

3.2.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur analytischen Auftrennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichts wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese verwendet. Die Methode basiert auf der Bindung von SDS an die Proteine, wobei die Ladung des SDS die Eigenladung von Proteinen effektiv maskiert. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine im elektrischen Feld ist dann proportional zur Masse. Die Proteine wurden vor der Auftrennung im Gel auf

95°C erhitzt und in DTT-haltigem SDS-Ladepuffer gelöst, was zur Spaltung der Disulfidbrücken und zur Auflösung von Sekundär- und Tertiärstrukturen führt.

Das Trenngel und Sammelgel wurden nacheinander gegossen. Das Trenngel (6% Acrylamid) wurde zwischen zwei Glasplatten, die durch zwei Abstandshalter am Rand voneinander getrennt sind, gegossen und mit Isopropanol überschichtet, um die Ausbildung eines Meniskus zu verhindern und Luftausschluss zu gewährleisten. Nach Aushärten des Gels wurde das Sammelgel (10-15% Acrylamid) gegossen, wobei ein Kunststoffkamm in das Sammelgel eingeführt wurde, um die Probentaschen zu modellieren. Nach vollständiger Polymerisation des Sammelgels wurde das Gel in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt, die anschließend mit SDS-Laufpuffer gefüllt wurde. Die Proteinproben wurden mit 5x SDS-Probenpuffer versetzt und durch Inkubation für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Proben und ein Größenstandard wurden auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung der Proteine erfolgt zunächst bei 100 V, nachdem die Lauffront das Trenngel erreicht hat, bei 150 V.

Acrylamid

30% Rotiphorese Gel

10x SDS-Laufpuffer

333 mM Tris-HCl

1% (w/v) SDS

1,92 M Glycin

SDS-Trenngelpuffer

1,5 mM Tris-HCl pH 8,8

0,4% (w/v) SDS

SDS-Sammelgelpuffer

0,5 mM Tris-HCl pH 6,8

0,4% (w/v) SDS

5x SDS-Probenpuffer

300 mM Tris-HCl, pH 6,8

10% (w/v) SDS

40% (v/v) Glycerin

0,4% Bromphenolblau

150 mM DTT

3.2.3.4 Coomassie Blau-Färbung

Coomassie-Blau ermöglicht die unspezifische Anfärbung von Proteinen nach gelelektrophoretischer Auftrennung im Polyacrylamidgel. Der Farbstoff lagert sich an die basischen Seitenketten der Aminosäuren an. Für die Färbung wurde das Polyacrylamidgel 1

min in Puffer I in der Mikrowelle erhitzt (400 W) und 5 min bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Das Gel wurde jeweils 1 min in Puffer II, Puffer III und Puffer IV in der Mikrowelle (400 W) erhitzt. Die Entfärbung erfolgte durch Inkubation in Puffer IV für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler.

Coomassie-Puffer I

25% Isopropanol

10% Essigsäure

0,05% (w/v) Coomassie R250

Coomassie-Puffer II

10% Isopropanol

10% Essigsäure

0,005% (w/v) Coomassie R250

Coomassie-Puffer III

10% Essigsäure

0,002% Coomassie R250

Coomassie-Puffer IV

10% Essigsäure

3.2.3.5 Immunoblot und Detektion

Nach der Auftrennung über die SDS-Page wurden die Proteine in einem Elektroblob-Verfahren auf eine PVDF-Membran übertragen. In Abhängigkeit von den verwendeten Antikörpern wurde die Übertragung mittels des *semi-dry* oder *Tank-Blot* Verfahrens durchgeführt. Beim *semi-dry* Verfahren findet die Übertragung in einer Halbtrockenzelle statt während der *Tank-Blot* in einer mit Transferpuffer gefüllten Apparatur stattfindet. Die Äquilibration des SDS-Gels, der PVDF-Membran und der Whatman-Papiere erfolgte daher in den entsprechenden Puffern.

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurde die Membran über Nacht bei 4°C in Blockierungslösung auf dem Horizontalschüttler inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der PVDF-Membran mit dem entsprechenden Erstantikörper in der Blockierungslösung für eine Stunde bei RT. Durch dreimaliges Waschen (je 10 min) der Membran in TBS-T wurden die überschüssigen ungebundenen Antikörper von der Membran entfernt. Es folgte eine Inkubation der Membran mit dem Zweitantikörper für eine Stunde bei RT, ebenfalls in der Blockierungslösung verdünnt. Die PVDF-Membran wurde anschließend zweimal mit TBS-T und einmal mit TBS für je 10 min gewaschen.

In Abhängigkeit des verwendeten Zweitantikörpers erfolgte die Visualisierung der Proteinbanden entweder über Chemilumineszenz oder über die enzymatische Umwandlung der Alkalischen Phosphatase (AP)-Substrate BCIP und NBT. Die Reaktion erfolgte im AP-Puffer.

Semi-dry Transferpuffer

15 mM Tris-HCl, pH 8,3

120 mM Glycin

0,2% (w/v) SDS

10% Methanol

Tank-Blot Transferpuffer

15 mM Tris-HCl, pH 8,3

120 mM Glycin

0,2% (w/v) SDS

20% Methanol

TBS

20 mM Tris-HCl, pH 7,5

150 mM NaCl

TBS-T

TBS

0,05% (v/v) Tween20

Blockierungslösung

TBS

5% (w/v) BSA oder Milchpulver

AP-Puffer

100 mM Tris-HCl, pH 9,5

100 mM NaCl

5 mM MgCl₂

3.2.3.6 Reinigung von RAF-Proteinen mit GST-Tag

Anzucht des Überexpressionsstammes

Das NZA-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum wurde mit Hilfe einer über Nacht-Kultur eines Einzelklons (3.2.1.2) auf eine OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Die verwendeten Bedingungen für die Protein-Überexpression sind in **Tab. 3-25** beschrieben. Die Zellen wurden dann durch Zentrifugation (6000 g, 15 min, 4°C) sedimentiert und in Lysepuffer resuspendiert.

Tab. 3-25: Anzuchtbedingungen für die Reinigung der RAF-Proteine

<i>Protein</i>	<i>E. coli Stamm</i>	<i>IPTG (mM)</i>	<i>Expression (h)</i>	<i>Temperatur (°C)</i>
GST-CRAF-RBD	BL21(pLYsS)	0,5	2,5	37
GST-BRAF-433-765	Rosetta2	0,4	16	18

Zellaufschluss mittels French Press

Der mechanische Zellaufschluss erfolgte mittels der French-Press. Hierbei wurden die Bakterien drei bis viermal in eine vorgekühlte French-Press Zelle überführt und unter Druck aufgeschlossen, bis eine visuelle Klärung der Bakterienlösung zu erkennen war. Die

anschließende Zentrifugation (17000 g, 30 min, 4°C) trennte die Zelltrümmer vom proteinhaltigen Überstand.

Reinigung über GST-Agarose Beads

Der geklärte Überstand wurde mit äquilibrierten GST-Agarose Beads (0,5 ml/Liter Kultur) in einem 50 ml Falcon-Reaktionsgefäß für zwei Stunden bei 4°C inkubiert. Der nichtgebundene proteinhaltige Überstand wurde mittels Zentrifugation (500 g, 5 min, 4°C) entfernt und die Agarose Beads dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Es folgten drei Elutionsschritte durch die Zugabe von Elutionspuffer (0,5 ml/ml Agarose Beads) und anschließender Zentrifugation. Die eluierten GST-fusionierten Proteine wurden nach Umpufferung über PD10-Säulchen mit Hilfe von Centricon-Säulchen einkonzentriert und im Lagerungspuffer aufgenommen. Abhängig von ihrer Proteinkonzentration (3.2.3.2) wurden entsprechende Aliquots pipettiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Lysepuffer

50 mM Tris-HCl, pH 7,5 (4°C)
150 mM NaCl
1% (v/v) TritonX-100
1 mM DTT

Waschpuffer

50 mM Tris-HCl, pH 7,5 (4°C)
150 mM NaCl
0,5% (v/v) TritonX-100
1 mM DTT

Elutionspuffer

50 mM Tris-HCl, pH 8,0
10 mM reduziertes Glutathion

Lagerungspuffer

50 mM Tris-HCl, pH 7,5
150 mM NaCl
1 mM DTT

Für die Reinigung von GST-BRAF-433-765 wurde dem Lyse- und Waschpuffer 5 mM $MgCl_2$ hinzugefügt. Alle Puffer wurden frisch angesetzt.

3.2.3.7 *in vitro* GST-Pulldown Assay

Um eine mögliche Interaktion von HTRA1 mit rekombinanten RAF-Proteinen (3.2.3.6) zu untersuchen wurde ein *in vitro* GST-Pulldown Assay durchgeführt. Hierbei wurde HTRA1 mit GST-gekoppelten RAF-Proteinen für eine Stunde bei 37°C im Pulldown-Puffer inkubiert und die Proteine nach dreimaligem Waschen über GST-Agarose Beads oder Strep-Tactin Beads (Qiagen) in 2x SDS-Probenpuffer (100 mM DTT) für 10 min bei 95°C eluiert. Die rekombinanten Proteine wurden vor der Inkubation mit HTRA1 mit 50 µl der jeweiligen Beads für eine Stunde bei 4°C inkubiert und zweimal in Puffer gewaschen, um ungebundene

Proteine zu entfernen. Die Proben der einzelnen Schritte wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und mittels Coomassie-Blau Färbung (3.2.3.4) visualisiert.

Tab. 3-26: Verwendete Proteine für den *in vitro* GST-Pulldown Assay

<i>Protein</i>	<i>Tag</i>	<i>Menge (µg)</i>	<i>Herkunft</i>
HTRA1Δmac SA	Strep	25	Laborbestand (M. Breiden)
HTRA1ΔmacΔPDZ SA	Histidin	25	Laborbestand (M. Merdanovic)
CRAF-RBD	GST	25	aus dieser Arbeit
BRAF 433-765	GST	25	aus dieser Arbeit
GST	GST	50	Laborbestand (Y. Behrens)

Pulldown-Puffer

50 mM Tris-HCl, pH 7,5 (37°C)

150 mM NaCl

3.2.3.8 Messung der proteolytischen Aktivität von HTRA1

Um zu untersuchen, ob synthetische RAF-Peptide die proteolytische Aktivität von HTRA1 beeinflussen, wurde HTRA1 mit dem bekannten Substrat β -Casein inkubiert und der proteolytische Abbau mittels SDS-PAGE (3.2.3.3) und Coomassie-Blau Färbung (3.2.3.4) verfolgt. Um zu überprüfen, ob die RBD von CRAF ein neues Substrat für HTRA1 darstellt, wurde auch dieses mit HTRA1 inkubiert.

Die Substrate β -Casein (20 µM) und CRAF-RBD (20 µM) wurden mit HTRA1Δmac (1 µM) in 50 mM Tris HCl pH 8,0 gemischt und bei 37°C inkubiert. Die Inkubationszeit richtete sich nach der Abbaugeschwindigkeit des verwendeten Substrates. Zuvor wurden die synthetischen RAF-Peptide (50 µM) mit HTRA1Δmac inkubiert (10 min, 37°C). Um dann einen vorhandenen Abbau zu verfolgen wurden nach mehreren Zeitpunkten Proben aus den Reaktionsansätzen entnommen, diese mit SDS-Probenpuffer versetzt und bei 95°C erhitzt. Anschließend erfolgte eine Analyse mittels SDS-Gelelektrophorese.

4 Ergebnisse

4.1 Epigenetische Regulation von *HTRA1* durch MBD2

Die Genexpression von *HTRA1* ist in vielen Krebszelllinien herunterreguliert (Baldi et al., 2002; Chien et al., 2004b). Ein möglicher Mechanismus, der die *HTRA1*-Genexpression regulieren kann, sind epigenetische Modifikationen, wie Methylierung der chromosomalen DNA und Histonmodifikationen (Bergman and Cedar, 2013; Zentner and Henikoff, 2013). In einer vorherigen Arbeit wurde eine CpG-Insel im Bereich des *HTRA1*-Promoters charakterisiert und gezeigt, dass in der Kolonkarzinomzelllinie HCT116 ein hoher Grad an DNA-Methylierung vorliegt und diese mit einer niedrigen *HTRA1*-Genexpression korreliert. Die Kolonkarzinomzelllinie SW480 zeigt dagegen keine Methylierung der DNA am *HTRA1*-Promoter und weist eine deutlich höhere *HTRA1*-Genexpression auf (Dissertation I. Irle). Im Folgenden sollte ein möglicher epigenetischer Mechanismus der Herunterregulation von *HTRA1* näher charakterisiert werden und zusätzlich die Genexpression von *HTRA2* und *HTRA3* in diesen beiden Kolonkarzinomzelllinien untersucht werden, da auch diese beiden Gene in Tumorzellen einer veränderten Genexpression unterliegen können.

4.1.1 Vergleich der *HTRA*-Genexpression in HCT116 und SW480 Kolonkarzinomzellen

Neben einer verringerten *HTRA1*-Genexpression ist ebenso eine veränderte *HTRA2*- und *HTRA3*-Genexpression in einigen Tumorgeweben beschrieben worden. Zudem gibt es für die Genexpression von *HTRA3* Hinweise auf eine epigenetische Regulierung (Narkiewicz et al., 2008; Narkiewicz et al., 2009b). Anknüpfend an die vorherige Arbeit sollen zunächst die verschiedenen *HTRA*-Gene in den HCT116 und SW480 Kolonkarzinomzellen auf ihre Expression hin untersucht werden. Es soll überprüft werden, ob sich auch die Genexpression von *HTRA2* und *HTRA3* in den beiden Kolonkarzinomzellen unterscheiden. Dazu wurde RNA aus diesen Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine qPCR zur relativen Quantifizierung der *HTRA*-Genexpressionen durchgeführt. Die ebenfalls gemessenen Genexpressionen von *Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase* (GAPDH) und *Ribosomalem Protein L13A* (RibProt) wurden zur Relativierung der *HTRA*-Gene verwendet. Die Auswertung der qPCR ist in Abb. 4-1 gezeigt.

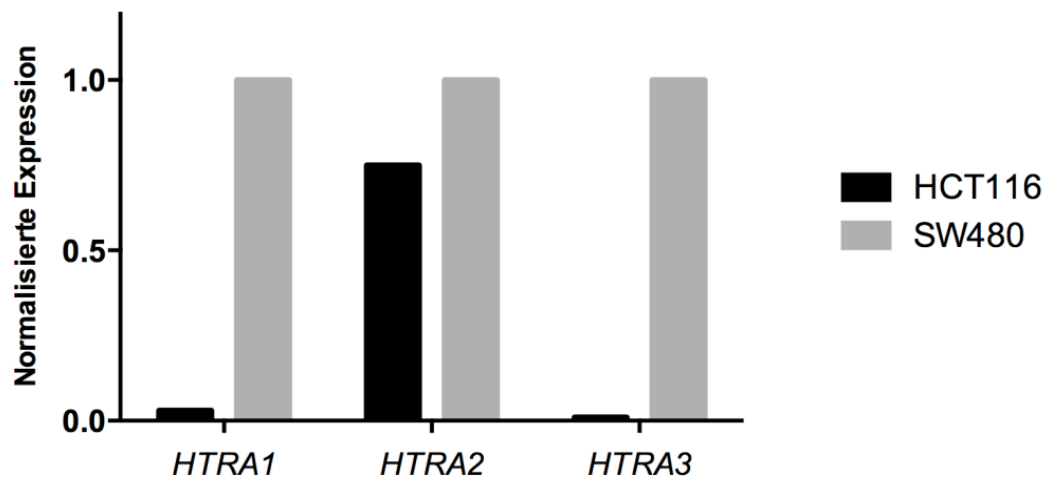


Abb. 4-1: Genexpression von *HTRA1*, *HTRA2* und *HTRA3* in HCT116 und SW480 Zelllinien

Die mittlere relative Genexpression wurde mittels qPCR über den Gehalt an mRNA von *HTRA1*, *HTRA2* und *HTRA3* bestimmt und die Genexpression der HCT116 Zellen zur Genexpression der SW480 Zellen normalisiert. Zuvor wurde die Genexpression der *HTRA*-Gene zu den *housekeeper*-Genen *GAPDH* und *RibProt L13A* relativiert.

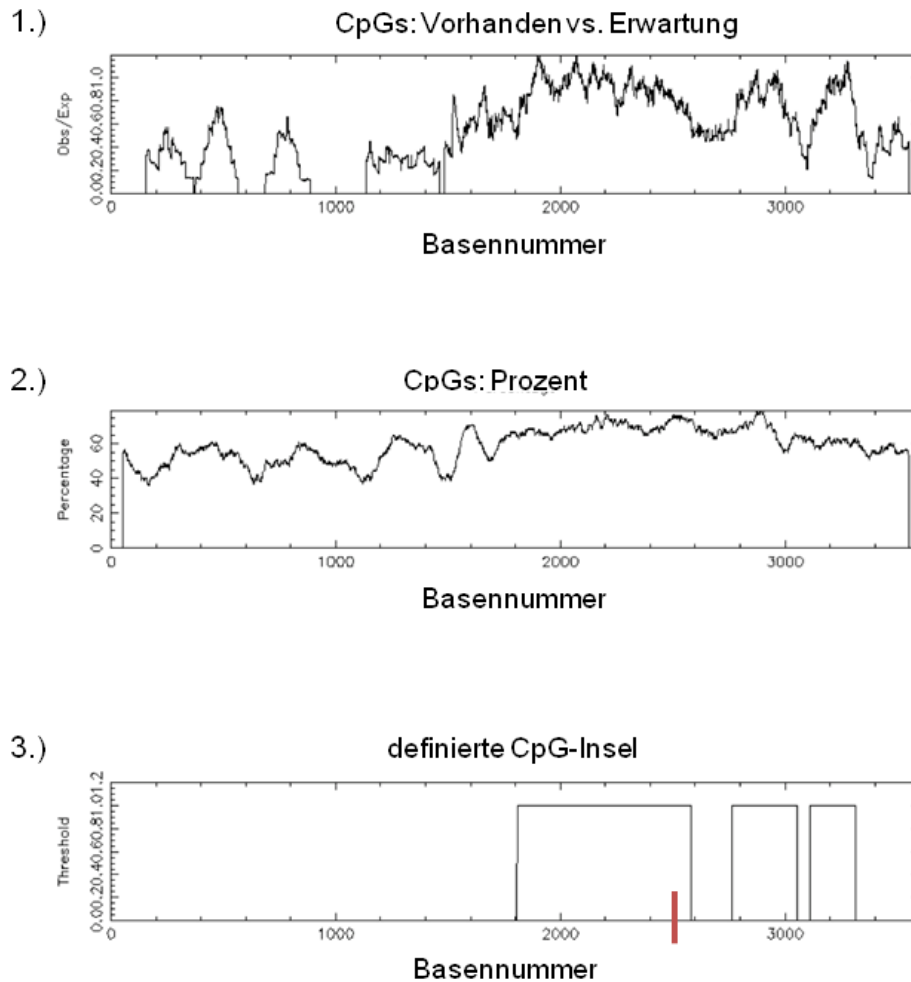
Die Auswertung der qPCR zeigt eine deutlich erniedrigte *HTRA1*- und *HTRA3*-Genexpression in der HCT116 Zelllinie. Die *HTRA2*-Genexpression hingegen war im Vergleich zu der SW480 Zelllinie nur leicht verringert (Abb. 4-1).

4.1.2 Nachweis einer CpG-Insel (CpGI) im *HTRA2*- und *HTRA3*-Promotor

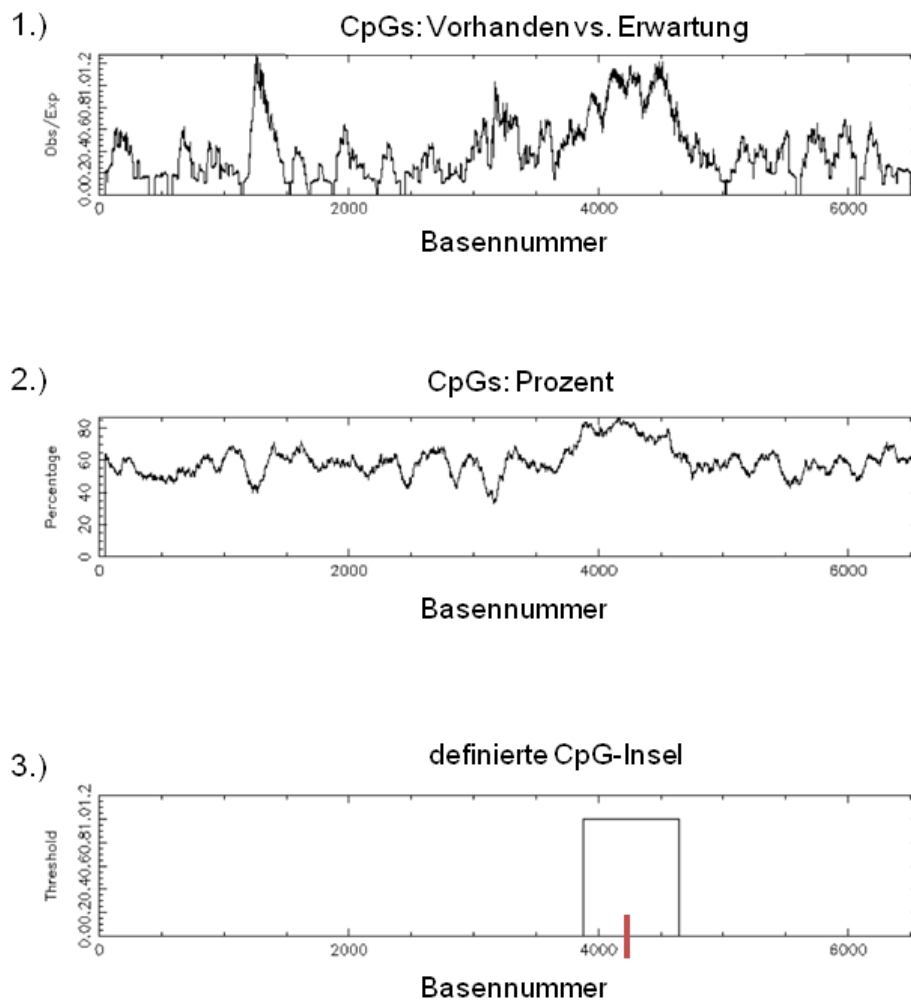
Da die niedrige *HTRA1*-Genexpression in der HCT116 Zelllinie im Zusammenhang mit einer erhöhten DNA-Methylierung in der Promotorregion steht, stellt sich die Frage, ob auch die Verringerung der *HTRA3*-Genexpression mit einer DNA-Methylierung des Promotors korreliert. Hierfür wurde der *HTRA2*- und *HTRA3*-Promotor auf eine erhöhte CpG-Dichte hin untersucht, die dann auf das Vorhandensein einer CpGI schließen lassen und auf eine epigenetische Regulation hinweisen können. Dafür wurde die Software CpGPlot/CpGReport verwendet. Das Programm berechnet das Verhältnis der in einer Nukleotidsequenz vorhandenen Anzahl von CpG-Dinukleotiden zu der Anzahl der erwarteten CpG-Dinukleotide über ein Fenster von 100 bp, das entlang der zu analysierenden Sequenz bewegt wird. Eine CpGI ist definiert als eine Region, in der die für die Sequenz berechnete Summe aus Prozent G und Prozent C über 50% liegt und das Verhältnis von vorhandenen CpG-Stellen zu erwarteten CpG-Stellen größer als 0,6 ist (Gardiner-Garden and Frommer, 1987). Regionen, die diese Kriterien erfüllen, werden von dem Programm als CpGI klassifiziert.

Für die *in silico*-Analyse der *HTRA2*- und *HTRA3*-Promotorregionen wurden die Sequenzen der Promotoren in das Programm CpGPlot/CpGReport (ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_cpghplot) eingegeben. Das Ergebnis ist in Abb. 4-2 abgebildet.

a) *HTRA2*



b) HTRA3

Abb. 4-2: *In silico*-Analyse des *HTRA2*- und *HTRA3*-Promotors

- a) Die Sequenz des *HTRA2*-Promotors und die umliegende Region wurden für die *in silico*-Analyse verwendet. Der obere Balken (1.) zeigt das Verhältnis von vorhandenen CpG-Stellen zu erwarteten CpG-Stellen, der mittlere Balken (2.) zeigt die Summe an Cytosinen und Guaninen in Prozent. Im unteren Balken (3.) ist die Position der ermittelten CpG-Insel hervorgehoben. Der Transkriptionsstart (ATG) liegt an Position 2525 (roter Strich).
- b) Die Sequenz des *HTRA3*-Promotors und die umliegende Region wurden für die *in silico*-Analyse verwendet. Die Darstellung der einzelnen Balken ist in a) beschrieben. Der Transkriptionsstart (ATG) liegt hier an Position 4205 (roter Strich).

Die *in silico*-Analyse zeigt, dass die Sequenz der Promotoren von *HTRA2* und *HTRA3* eine erhöhte Dichte von CpG-Dinukleotiden aufweisen und die eingegebenen Sequenzen die Charakteristika einer CpGI erfüllen. Die Summe an Cytosinen und Guaninen liegt über 50%

und das Verhältnis von vorhandenen CpG-Stellen zu erwarteten CpG-Stellen ist größer als 0,6. Demzufolge könnte in beiden Promotorregionen eine CpGI lokalisiert sein.

4.1.3 Methylierungsanalyse des *HTRA2*- und *HTRA3*-Promotors

Aufgrund der bioinformatisch vorhergesagten CpG-Inseln stellt sich die Frage, ob eine Methylierung der DNA in dieser Region vorliegt, die möglicherweise einen Einfluss auf die jeweilige Genexpression hat. Für die Methylierungsanalyse wurde aus den HCT116 und SW480 Zellen genomische DNA isoliert und die nichtmethylierten Cytosine durch eine Behandlung mit Bisulfit in Uracil konvertiert. Ausgehend von dieser DNA wurden jeweils zwei Bereiche aus der Promotorregion amplifiziert und nach Subklonierung mittels Sequenzierung analysiert. Zur Auswertung der Sequenzierungsdaten wurde das Programm *BIQAnalyzer* verwendet, welches u.a. die Konvertierungsrate und Sequenzhomologien zwischen den einzelnen Klonen berücksichtigt, um zu vermeiden, dass die Ergebnisse aus nur einem amplifizierten Klon hervorgehen. Die Sequenzierungsergebnisse sind in Form der sog. *Lollipop*-Darstellung abgebildet, hierbei sind die einzelnen CpG-Dinukleotide als Kreise dargestellt. Ein weißer Kreis bedeutet ein unmethyliertes Cytosin, ein schwarz gefüllter Kreis repräsentiert eine Methylierung am jeweiligen Cytosin. Ein Strich deutet an, dass an dieser Position während des *Alignments* der Sequenzierreaktionsergebnisse mit der genomischen Sequenz keine Base zugeordnet werden konnte. Die Auswertung der DNA-Methylierung am *HTRA2*-Promotor ist in Abb. 4-3 gezeigt.

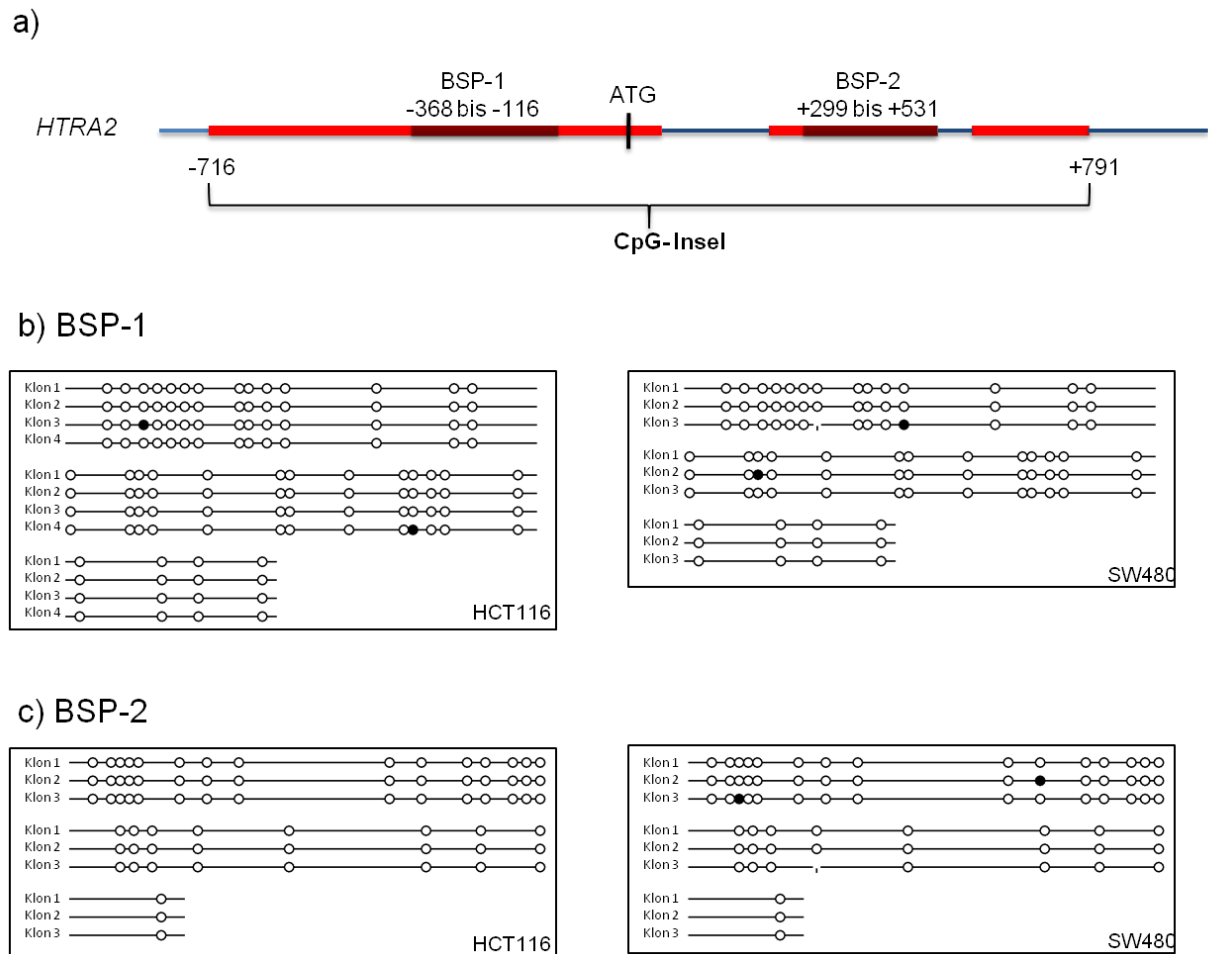


Abb. 4-3: Schematische Darstellung und DNA-Methylierung der *HTRA2*-Promotorregion

- a) Schematische Darstellung der humanen *HTRA2*-Promotorregion. Die CpGI ist in rot abgebildet und die zur Sequenzierung verwendeten Bereiche BSP-1 und BSP-2 sind dunkel hinterlegt.
- b) Von den HCT116 und SW480 Kolonkarzinomzelllinien wurde die genomische DNA isoliert, diese mit Bisulfit behandelt und die *HTRA2*-BSP-1-Region (252 bp) mittels PCR amplifiziert. Die in *E. coli* transformierten Subklone wurden anschließend sequenziert und auf ihre Methylierung hin analysiert.
- c) Von den HCT116 und SW480 Kolonkarzinomzelllinien wurde die genomische DNA isoliert, diese mit Bisulfit behandelt und die *HTRA2*-BSP-2-Region (232 bp) mittels PCR amplifiziert. Die in *E. coli* transformierten Subklone wurden anschließend sequenziert und auf ihre Methylierung hin analysiert.

Die Auswertung der Sequenzierungsdaten zeigt eine beinahe methylierungsfreie Region am *HTRA2*-Promotor. Sowohl die Promotorregion der HCT116 als auch die der SW480 Zelllinie weisen höchstens zwei methylierte Cytosine auf. Insgesamt wurden 30 (BSP-1, a)) bzw. 24 (BSP-2, b)) CpG-Dinukleotide analysiert.

Der *HTRA3*-Promotor wurde nach dem gleichen Verfahren analysiert wie es beim *HTRA2*-Promotor beschrieben wurde.

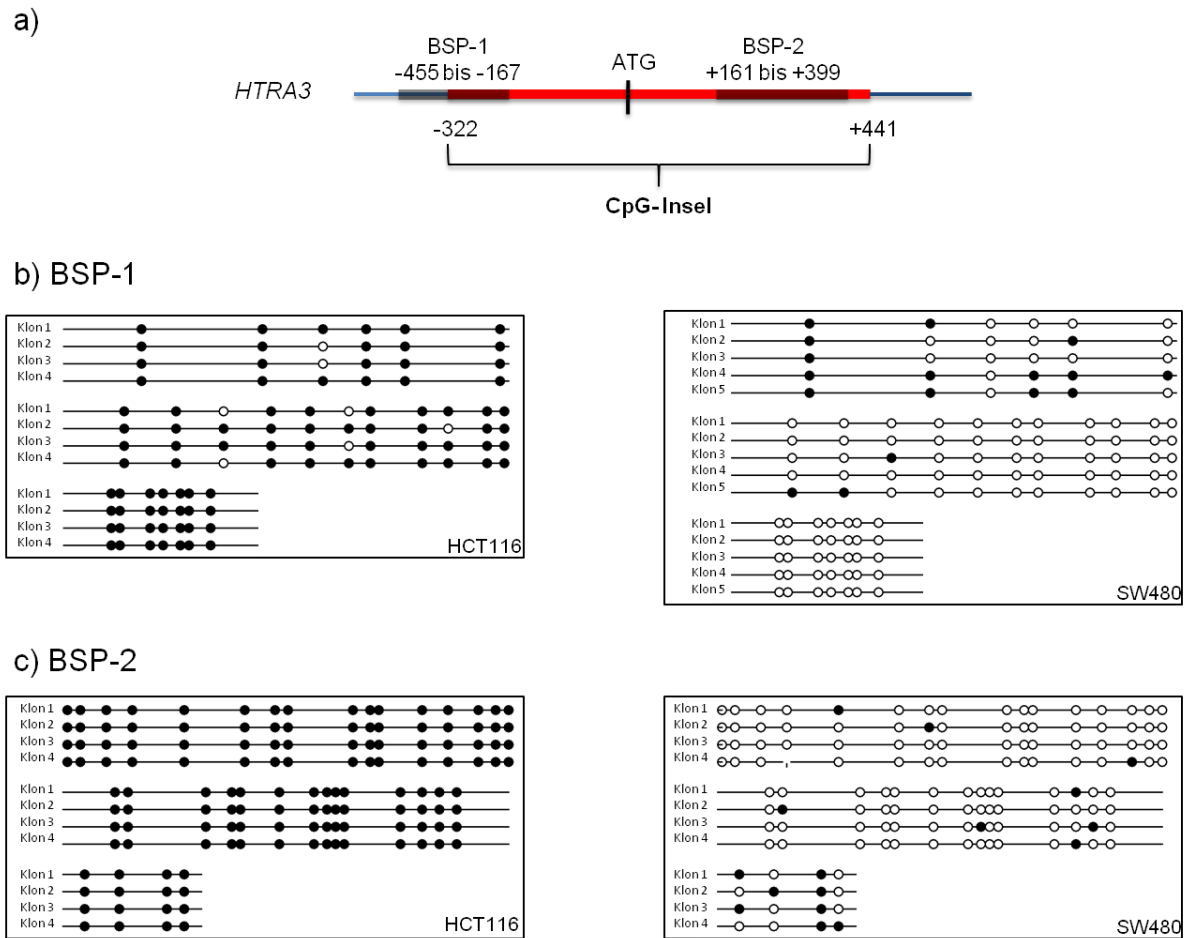


Abb. 4-4: Schematische Darstellung und DNA-Methylierung der *HTRA3*-Promotorregion

- a) Schematische Darstellung der humanen *HTRA3*-Promoterregion. Die CpGI ist in rot abgebildet und die zur Sequenzierung verwendeten Bereiche BSP-1 und BSP-2 sind dunkel hinterlegt.
- b) Von den Kolonkarzinomzelllinien HCT116 und SW480 wurde die genomische DNA isoliert, diese mit Bisulfit behandelt und die *HTRA3*-BSP-1-Region (288 bp) mittels PCR amplifiziert. Die in *E. coli* transformierten Subklone wurden anschließend sequenziert und auf ihre Methylierung hin analysiert.
- c) Von den Kolonkarzinomzelllinien HCT116 und SW480 wurde die genomische DNA isoliert, diese mit Bisulfit behandelt und die *HTRA3*-BSP-2-Region (238 bp) mittels PCR amplifiziert. Die in *E. coli* transformierten Subklone wurden anschließend sequenziert und auf ihre Methylierung hin analysiert.

Die Sequenzierungsdaten zeigen hier, dass der *HTRA3*-Promotor in der HCT116 Zelllinie zu fast 100% aus methylierten Cytosinen besteht. Wohingegen der *HTRA3*-Promotor in der SW480 Zelllinie nur vereinzelt methylierte Cytosine an den untersuchten CpG-Dinukleotiden aufweist. Am *HTRA3*-Promotor wurden insgesamt 24 (BSP-1, a)) bzw. 34 (BSP-2, b)) CpG-Dinukleotide auf ihren Methylierungsstatus hin untersucht. Die hohe Dichte an methylierten Cytosinen in den HCT116 Zellen kann eine mögliche Erklärung für die stark erniedrigte *HTRA3*-Genexpression sein.

Da die DNA-Methylierung der jeweiligen BSP-1 und BSP-2 Regionen in beiden *HTRA*-Promotoren sehr ähnliche Muster zeigen, ist davon auszugehen, dass die ausgewählten amplifizierten Bereiche den Grad der Methylierung der jeweils gesamten CpGI widerspiegeln.

4.1.4 Die *HTRA*-Genexpression nach dem knockdown von *MBD2*

Vorherige Arbeiten haben gezeigt, dass der *knockdown* des Methyl-DNA bindenden Proteins *MBD2* mit Hilfe einer shRNA zu einer erhöhten *HTRA1*-Genexpression führte. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass *MBD2* für die epigenetische Regulation von *HTRA1* mitverantwortlich ist. Aufgrund der nachgewiesenen CpGI am *HTRA2*- und *HTRA3*-Promotor und insbesondere der stark ausgeprägten DNA-Methylierung am *HTRA3*-Promotor in der HCT116 Zelllinie sollte die *HTRA2*- und *HTRA3*-Genexpression als Folge des *MBD2*-*knockdowns* gemessen werden. Hierzu wurden die parentalen, mit einem Leervektor transfizierte und zwei mit der *MBD2*-shRNA transfizierte HCT116 Zelllinien analysiert. Aus diesen Zellen wurde in frühen Passagen die RNA isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR die relativen Genexpressionen untersucht.

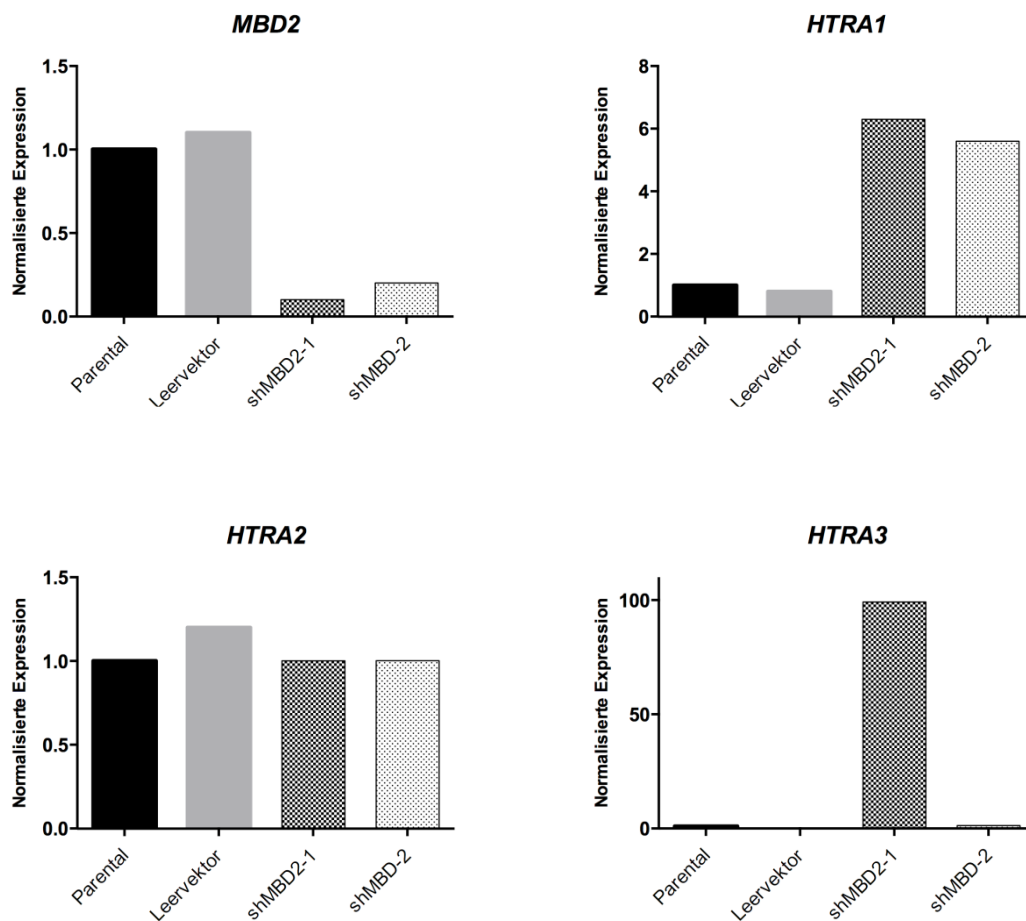


Abb. 4-5: Genexpression von *MBD2*, *HTRA1*, *HTRA2* und *HTRA3* in HCT116-Zellen

Die mittlere relative Genexpression von der parentalen, der Leervektor-transfizierten und den beiden MBD2-shRNA-transfizierten HCT116-Zellen wurde mittels qPCR über den Gehalt der jeweiligen mRNA bestimmt. Die Genexpressionen von *MBD2*, *HTRA1*, *HTRA2* und *HTRA3* wurden zur Genexpression von *GAPDH* und *RibProtL13A* relativiert und anschließend zur jeweiligen Genexpression der parentalen HCT116 Zelllinie normalisiert.

Die qPCR-Daten zeigen einen effizienten *knockdown* von *MBD2* in der HCT116-shMBD2-1 und HCT116-shMBD2-2 Zelllinie um jeweils etwa 90%. Der Verlust von MBD2 führte dann in diesen Zellen zu einer 6-fachen Erhöhung der *HTRA1*-Genexpression, wohingegen die von *HTRA2* nicht verändert war. Die *HTRA3*-Genexpression zeigt in der HCT116-shMBD2-1 Zelllinie eine 100-fache Erhöhung und in der HCT116-shMBD2-2 Zelllinie keine Veränderung. Die Beobachtung, dass lediglich eine shMBD2-transfizierte Zelllinie eine Erhöhung von *HTRA3* aufweist, lässt eher auf einen unspezifischen *off-target* Effekt als Folge der Transfektion schließen als auf einen MBD2-abhängigen Effekt.

4.1.5 MBD2 bindet an den HTRA1-Promotor

Die Beobachtung, dass der Verlust von MBD2 zu einer Erhöhung der *HTRA1*-Genexpression in der HCT116 Zelllinie führt und auch in diesen Zellen eine stark ausgeprägte Methylierung am *HTRA1*-Promotor gezeigt worden ist (Dissertation I.Irle), unterstützt die Hypothese, dass MBD2 an den methylierten *HTRA1*-Promotor binden kann. Die Bindung von MBD2 würde dann die Rekrutierung eines Repressorkomplexes mit sich führen (Lai and Wade, 2011), der zu einer Genrepression von *HTRA1* und einer gleichzeitigen Deacetylierung der Histone führt. Die Histondeacetylase HDAC1 deacetyliert z.B. spezifisch die Lysinreste 9, 14 und 18 an Histon H3. Um solch eine Protein-DNA-Interaktion zu untersuchen ist die Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) die Methode der Wahl. Für die Bindungsanalyse von MBD2 an den *HTRA1*-Promotor wurden die HCT116 und SW480 Zelllinien verwendet, da hier durch die festgestellte starke DNA-Methylierung (HCT116) bzw. sehr geringe DNA-Methylierung (SW480) des *HTRA1*-Promotors eine Bedingung für eine eventuelle Bindung von MBD2 lediglich in den HCT116 Zellen gegeben ist.

Die ChIP-Methode setzt eine gleichmäßige Fragmentierung der chromosomalen DNA in Stücke von etwa 300 bp Länge voraus. Die präzipitierten DNA-Fragmente sollten lang genug sein, um anschließend als Matrize für die qPCR verwendet werden zu können und gleichzeitig kurz genug, um eine möglichst hohe Spezifität der MBD2-Bindestelle zu gewährleisten. Dazu wurden die Zellen zunächst mit Formaldehyd behandelt, um die Bindungen zwischen DNA und Proteinen zu fixieren, es folgte eine Zelllyse, der cytoplasmatische Überstand wurde verworfen und das Zellkernlysate mit der chromosomalen DNA mit Hilfe von Ultraschall behandelt. Um zu überprüfen, ob die DNA-Fragmente die geeignete Sequenzlänge aufweisen, wurde nach verschiedenen Zeitpunkten eine Probe von der Ultraschallbehandlung entnommen und diese mittels eines Agarosegels elektrophoretisch aufgetrennt.

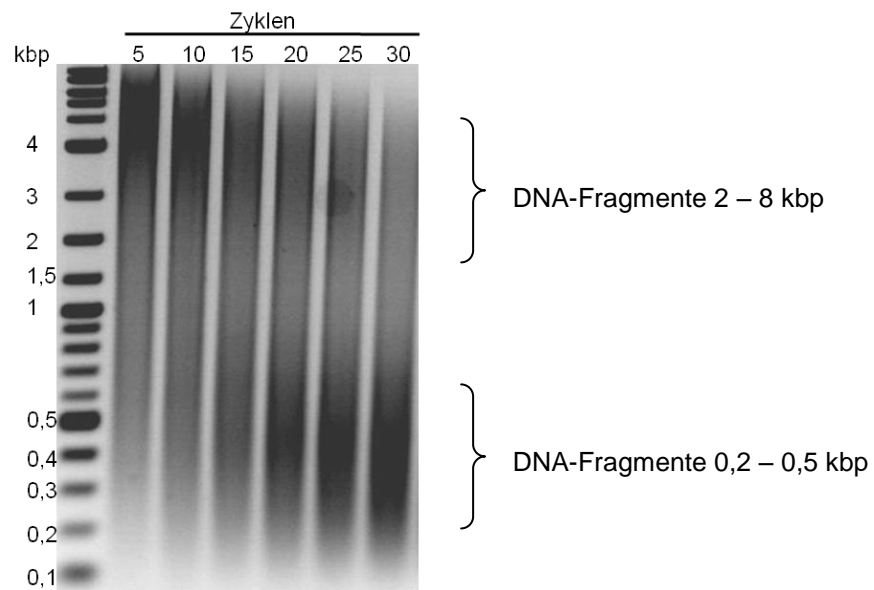
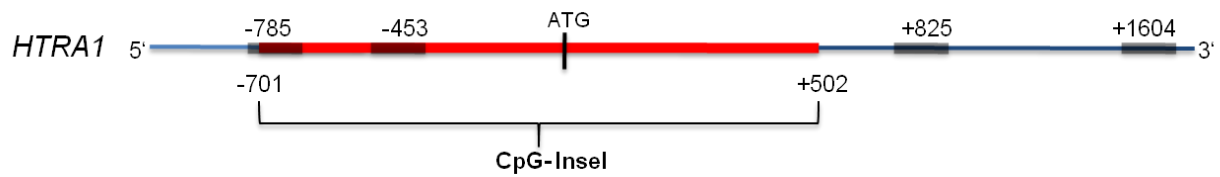


Abb. 4-6: Zellkernlysate nach Ultraschallbehandlung

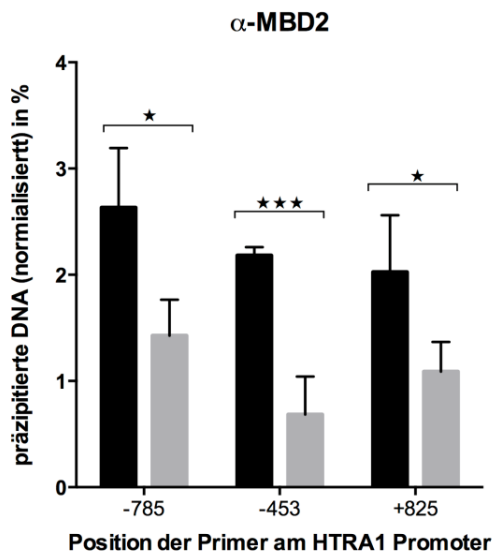
Nach jeweils fünf Zyklen der Ultraschallbehandlung (Zyklus: 1 min Puls, 1 min Pause) wurden die Proben der chromosomalen DNA entnommen, mit DNA-Ladepuffer versetzt und elektrophoretisch aufgetrennt, um die Größenverteilung der DNA-Fragmente zu überprüfen.

Das Agarosegel (Abb. 4-6) zeigt, dass mit steigender Intensität der Ultraschallbehandlung die Größe der DNA-Fragmente abnimmt. Nach 30 Ultraschallzyklen besteht das chromosomale Lysat überwiegend aus DNA-Fragmenten von einer Länge zwischen 200 und 500 bp. Dieses chromosomale Lysat wurde jeweils mit einem Antikörper gegen MBD2 und acetyliertem Lysin 9 an Histon H3 (H3K9ac) inkubiert, um die daran gebundene DNA zu eluieren und mittels ChIP-qPCR zu quantifizieren. Zusätzlich wurde ein Histon H3-Antikörper verwendet, um die Acetylierung von Lysin 9 am Histon 3 mit dem Gesamtgehalt an Histon H3 in relation setzen zu können. Die H3K9 Acetylierung ist ein Marker für aktive Transkription. Für die ChIP-qPCR wurden Primer entworfen, welche die CpG am *HTRA1*-Promotor abdecken (Abb. 4-7a)). So kann eine Aussage darüber getroffen werden, in welchem Maße MBD2 an die unterschiedlichen Regionen bindet und ob eine Acetylierung von Lysin 9 am Histon H3 vorliegt.

a)



b)



c)

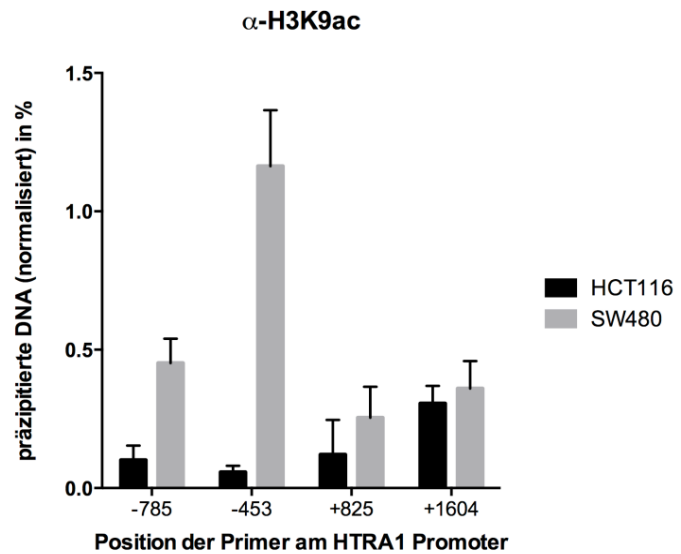


Abb. 4-7: Anreicherung von MBD2 und Anteil der H3K9-Acetylierung am *HTRA1*-Promotor

- a) Schematische Darstellung des humanen *HTRA1*-Promotors. Die CpGI ist in rot dargestellt und die zur ChIP-qPCR verwendeten Primer -785, -453, +825 und +1604 sind dunkel hinterlegt.
- b) Die mittels α -MBD2 präzipitierte DNA am *HTRA1*-Promotor in den HCT116 und SW480 Zelllinien. Der präzipitierte Anteil wurde zur Gesamt-Menge der eingesetzten DNA relativiert und dann zu einer unspezifischen Bindung des Antikörpers an das *GAPDH*-Gen normalisiert. Die statistische Signifikanz wurde durch einen ungepaarten t-Test ermittelt (* = $p < 0,05$, *** = $p < 0,001$).
- c) Die mittels α -H3K9ac präzipitierte DNA am *HTRA1*-Promotor in den HCT116 und SW480 Zelllinien. Der präzipitierte Anteil an H3K9ac und H3 wurde jeweils zur Gesamt-Menge der eingesetzten DNA relativiert. Zur Normalisierung wurde das Verhältnis beider Werte berechnet.

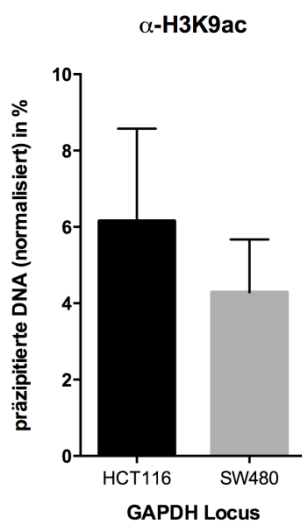
Die Ergebnisse der ChIP-qPCR (Abb. 4-7) zeigen eine signifikante Anreicherung von MBD2 am *HTRA1*-Promotor in der HCT116 Zelllinie, in der ebenfalls eine starke Methylierung der DNA nachgewiesen wurde. Die mittlere Primerposition -453 zeigt die stärkste Anreicherung von MBD2 ($p=0,0002$) in der HCT116 Zelllinie, wohingegen der Unterschied in der Bindung von MBD2 an den Positionen -785 und +825 im Vergleich zur SW480 Zelllinie leicht abnahm (-785: $p=0,01$, +825: $p=0,02$) (Abb. 4-7 b)). Die Anreicherung von acetyliertem Lysin 9 am Histon 3 zeigt eine entgegengesetzte Verteilung. Hier war eine Anreicherung in der SW480

Zelllinie zu beobachten, wobei auch hier der größte Unterschied zwischen den beiden Zelllinien an der Position -453 zu erkennen war. An der Position +1604, außerhalb der CpG-Insel, war eine fast gleich starke Acetylierung vorhanden (Abb. 4-7 c)). Die Anreicherung von acetyliertem H3K9 spricht für eine eher hohes Transkriptionslevel.

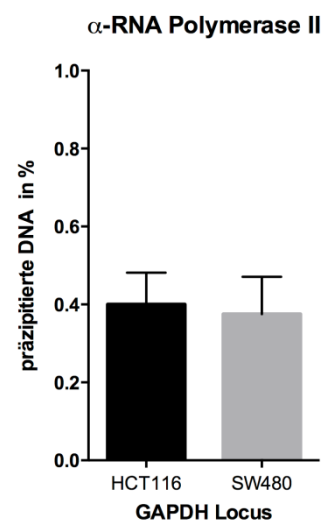
Die Daten deuten auf einen epigenetischen Regulationsmechanismus von *HTRA1* in den HCT116 Kolonkarzinomzellen, der über MBD2 vermittelt wird. Die mit Hilfe der ChIP-qPCR erhaltenen Werte sprechen dafür, dass MBD2 insbesondere an den Bereich nahe des *HTRA1*-Transkriptionsstart bindet (-453) und somit für eine Repression der Genexpression sorgen kann. Zusätzlich ist hier die geringste Acetylierung von Lysin 9 an Histon 3 vorhanden.

Die folgende Abbildung zeigt die bei jedem ChIP-Experiment durchgeführten Kontrollen.

a)



b)



c)

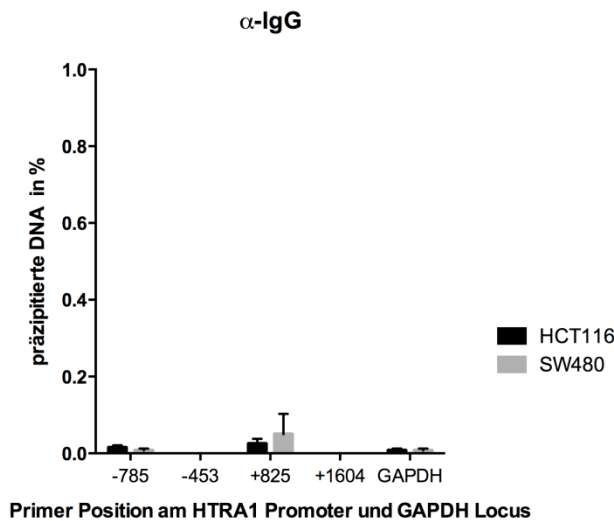


Abb. 4-8: Positiv- und Negativ-Kontrollen der durchgeführten ChIP-Experimente

- Die mittels α -H3K9ac präzipitierte DNA am *GAPDH*-Gen in der HCT116 und SW480 Zelllinie. Der präzipitierte Anteil an H3K9ac und H3 wurde jeweils zur Gesamt-Menge der eingesetzten DNA relativiert. Zur Normalisierung wurde das Verhältnis beider Werte berechnet.
- Die mittels α -RNA-Polymerase II präzipitierte DNA am *GAPDH*-Gen in der HCT116 und SW480 Zelllinie. Der präzipitierte Anteil wurde zur Gesamt-Menge der eingesetzten DNA relativiert.
- Die mittels α -IgG präzipitierte DNA am *HTRA1*-Promotor und *GAPDH*-Gen in der HCT116 und SW480 Zelllinie. Der präzipitierte Anteil wurde zur Gesamt-Menge der eingesetzten DNA relativiert.

Die mit Hilfe von α -RNA-Polymerase II präzipitierte DNA wurde auf ihre Bindung an das *GAPDH*-Gen quantifiziert (Abb. 4-8 b)). Vorherige qPCR-Daten (nicht abgebildet) und die hohe H3K9-Acetylierung am *GAPDH*-Gen (Abb. 4-8 a)) zeigen bzw. sprechen dafür, dass *GAPDH* wie erwartet in beiden Zelllinien stark exprimiert wird, somit wurde die Bindung der RNA-Polymerase II an dieses Gen als Positiv-Kontrolle der jeweiligen Experimente verwendet. Der Einsatz von α -IgG diente zur Berechnung der unspezifischen Antikörper-Bindungen an den jeweiligen Primerpositionen. Die Quantifizierung zeigt, dass sehr geringe DNA-Mengen mittels α -IgG unspezifisch präzipitiert wurden und durch die ChIP-qPCR gemessen wurden (Abb. 4-8 c)). Somit kann eine unspezifische Präzipitierung von DNA praktisch ausgeschlossen werden.

4.2 *HTRA1*-Genexpression und Methylierung in Melanom-Zelllinien

Eine verringerte Genexpression von *HTRA1* ist auch in Melanomzellen beobachtet worden (Baldi et al., 2002), wobei der Mechanismus nicht beschrieben ist. Um die

HTRA1-Genexpression in einem weiteren Tumorgewebe zu untersuchen wurden uns freundlicherweise 13 verschiedene Melanom-Zelllinien von der Hautklinik in Essen (Prof. Dirk Schadendorf) zur Verfügung gestellt. Hierbei handelt es sich um Primärkulturen aus Patientenmaterial, welche direkt aus metastasiertem, humanem Tumorgewebe entnommen und kultiviert wurden. Die Vorteile dieser Primärkulturen liegen zum einen in ihrem Herkunftsort, da ihre *in vitro*-Eigenschaften mit den *in vivo*-Eigenschaften in hohem Maße übereinstimmen. Es wird hierdurch eine äußerst exakte Simulation der *in vivo*-Verhältnisse dargestellt und folglich besitzen die gewonnenen Daten einen höheren klinischen Bezug. Ein weiterer Vorteil liegt in ihrem „kurzen“ Lebensalter. Im Gegensatz zu permanenten, etablierten Zelllinien, welche evtl. schon über Jahrzehnte kultiviert werden und sowohl morphologisch als auch funktionell stark von ihren ursprünglichen Eigenschaften differieren können, sind die Primärkulturen nach den relativ geringen Passagierzahlen kaum verändert. Die hier zur Analyse verwendeten Zelllinien weisen zusätzlich eine Mutation im *BRAF*- oder *NRAS*-Gen auf. Die vorhandenen *BRAF* V600E und *NRAS* Q61K Mutationen sind zwei sehr häufig auftretende Mutationen im Melanom. Die Zelllinien, welche keine Mutation in einem dieser Gene tragen, werden im Folgenden als Wildtyp-Zellen (WT) bezeichnet werden. Beide Mutationen führen zu einer Aktivierung des ERK-Signalweges, was insbesondere zu Zellwachstum, -proliferation und -differenzierung führt. Die molekularen Grundlagen der hierbei beteiligten Signalwege sind für die Entwicklung der Tumorthherapie von großer Bedeutung. Daher soll neben einer Methylierungsanalyse des *HTRA1*-Promoters und einer allgemeinen Charakterisierung dieser Melanom-Zelllinien ein möglicher Zusammenhang zwischen *HTRA1* und den Signalproteinen des ERK-Signalweges untersucht werden. Da auch für *HTRA1* gezeigt wurde, dass es in essentiellen zellulären Prozessen, wie Zellmigration, -überleben und -zykluskontrolle eine Rolle spielt.

4.2.1 Vergleich der *HTRA1*- und *HTRA2*-Genexpression in Melanom-Zelllinien

Die vorherigen Ergebnisse zeigen (4.1.5), dass *HTRA1* über epigenetische Mechanismen in einer Kolonkarzinomzelllinie ausgeschaltet werden kann. Im Folgenden soll nun die Genexpression von *HTRA1* in den Melanom-Zelllinien ermittelt und anschließend die Methylierung des *HTRA1*-Promoters untersucht werden. Die Genexpression von *HTRA1* soll mit der von *HTRA2* verglichen werden. Dazu wurde die RNA aus den Melanomzellen isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR die relativen Genexpressionen ermittelt.

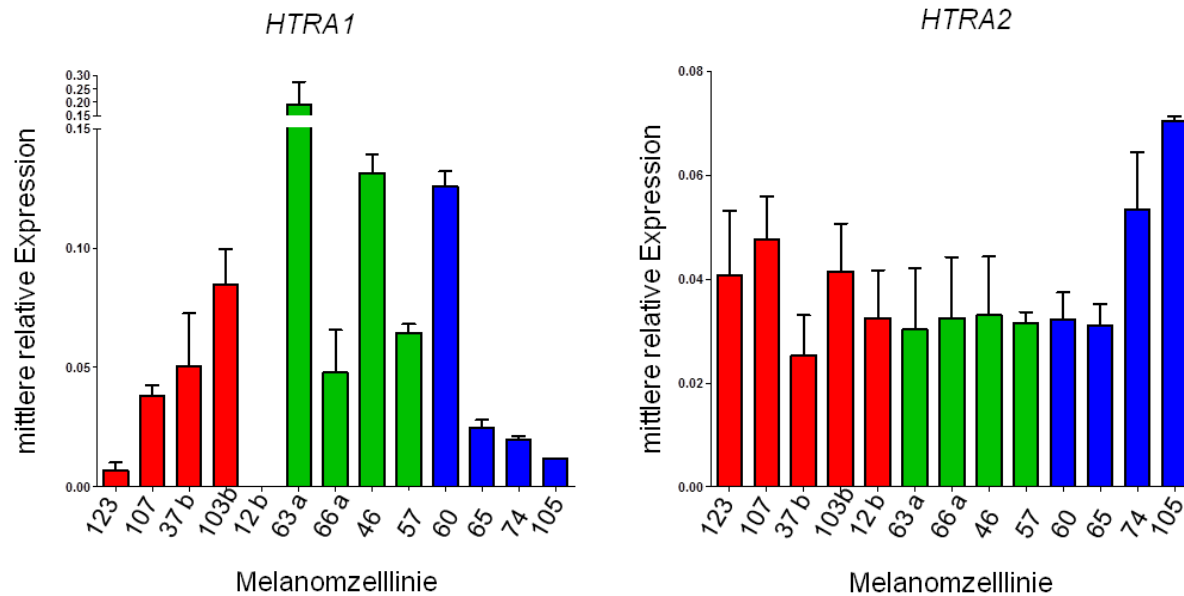


Abb. 4-9: Genexpression von *HTRA1* und *HTRA2* in Melanom-Zelllinien

Die mittleren relativen Genexpressionen von *HTRA1* (links) und *HTRA2* (rechts) wurden zur Genexpression der housekeeper-Gene *GAPDH* und *RibProtL13A* relativiert. Die Melanom-Zelllinien unterscheiden sich in ihrem Genotyp. WT = rot, BRAF V600E = grün, NRAS Q61K = blau.

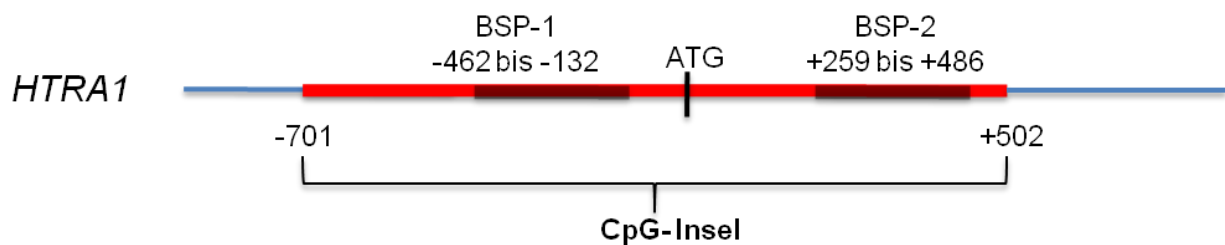
Die Ergebnisse der qPCR in Abb. 4-9 zeigen, dass die Genexpression von *HTRA1* in den verschiedenen Melanom-Zelllinien eine heterogene Verteilung aufweist. Eine sehr niedrige Genexpression war in fünf Melanom-Zelllinien zu beobachten (Nr. 12b, 65, 74, 105 und 123), wohingegen die Genexpression von *HTRA2* in den unterschiedlichen Zelllinien vergleichbar war. Die qPCR-Daten lassen keinen Zusammenhang zwischen dem jeweiligen Genotyp und der *HTRA1*-Genexpression erkennen und die Zelllinien aller drei Genotypen zeigen vergleichsweise höhere und auch geringere *HTRA1*-Genexpressionen.

4.2.2 Methylierungsanalyse des *HTRA1*-Promotors in Melanom-Zelllinien

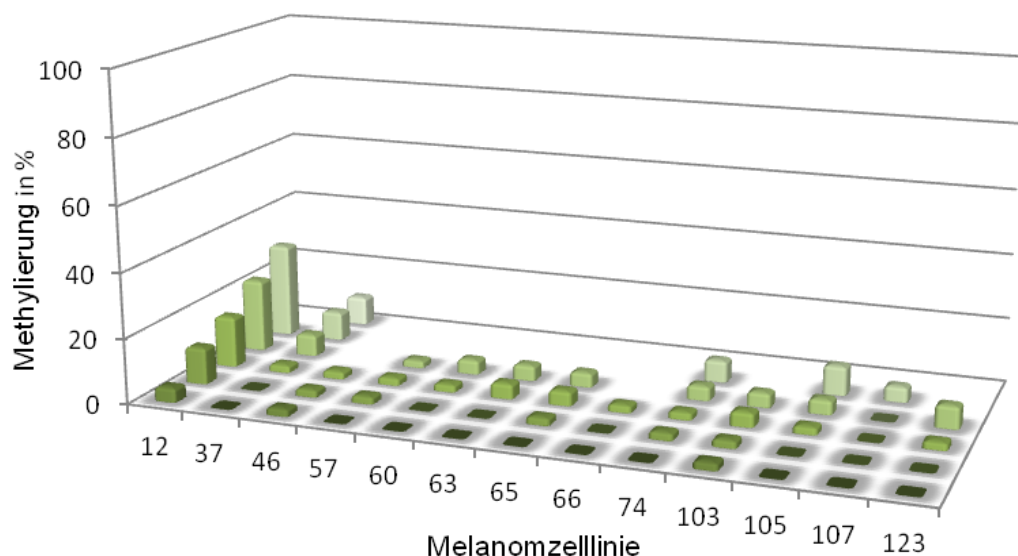
Das heterogene Expressionsmuster von *HTRA1* lässt vermuten, dass *HTRA1* in den Melanom-Zelllinien unterschiedlichen Regulationsmechanismen unterliegt und sich die Unterschiede in der *HTRA1*-Genexpression auch auf die Tumoreigenschaften der Melanom-Zelllinien auswirken kann. Bisher ist gezeigt worden, dass die DNA-Hypermethylierung am *HTRA1*-Promotor für die Herunterregulation von *HTRA1* in Eileiterkrebszelllinien verantwortlich ist (Chien et al., 2004b). Auch die bereits gezeigten Ergebnisse lassen auf eine methylierungsabhängige Genexpression von *HTRA1* in Kolonkarzinomzelllinien schließen. Anschließend an die Expressionsanalyse sollte daher die DNA-Methylierung des *HTRA1*-Promotors in den Melanom-Zelllinien untersucht werden. Für die

Methylierungsanalyse wurde aus den Melanom-Zelllinien genomische DNA isoliert und die nichtmethylierten Cytosine mittels einer Bisulfitbehandlung in Uracil konvertiert. Ausgehend von dieser DNA wurden jeweils zwei Bereiche aus der Promotorregion amplifiziert und nach Subklonierung und Sequenzierung mit Hilfe von *BIQAnalyzer* analysiert. Die folgenden Ergebnisse der Sequenzanalyse zeigen den prozentualen Anteil an methylierten CpG-Dinukleotiden abhängig von der Gesamt-Anzahl der analysierten CpG-Dinukleotide. Diese Art der Darstellung erlaubt einen Überblick aller sequenzierten Einzelklone. Die zwei für die Amplifizierung verwendeten Promotorbereiche sind in Abb. 4-10 a) dargestellt. Die BSP-1 Region enthält 44 CpG-Dinukleotide und in BSP-2 sind 33 CpG-Dinukleotide vorzufinden.

a)



b) BSP-1



c) BSP-2

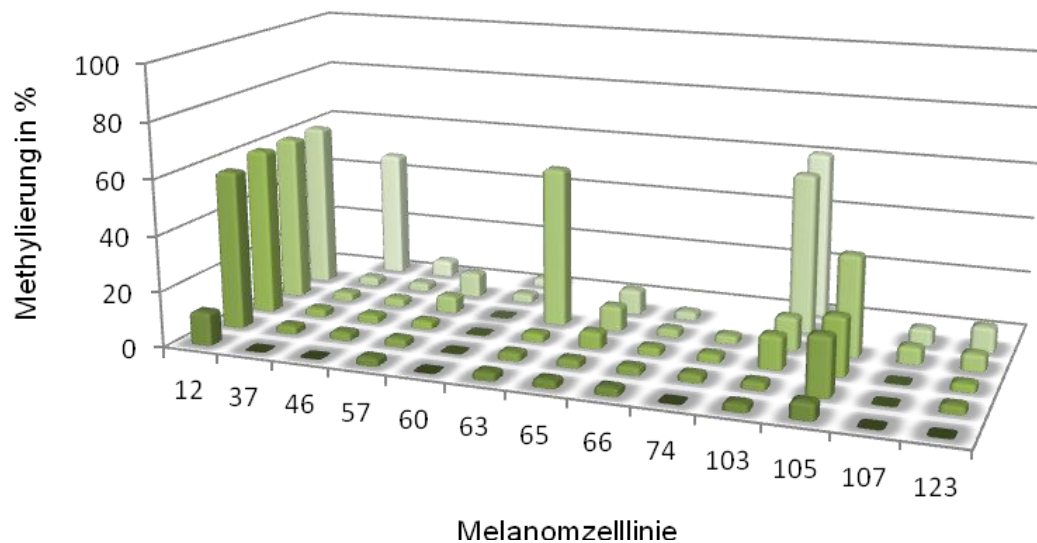


Abb. 4-10: Methylierungsanalyse des *HTRA1*-Promotors in Melanom-Zelllinien

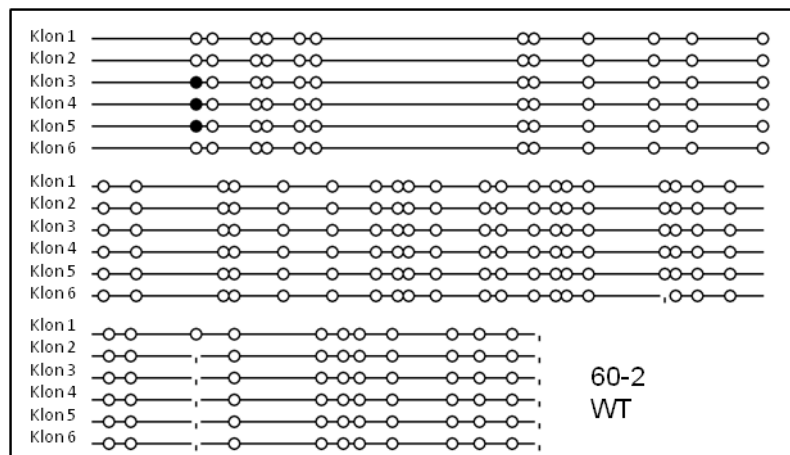
- a) Schematische Darstellung der humanen *HTRA1*-Promotorregion. Die CpGI ist in rot und die zur Sequenzierung verwendeten Bereiche BSP-1 und BSP-2 in schwarz abgebildet.
- b) Von den Melanom-Zelllinien wurde die genomische DNA isoliert, diese mit Bisulfit behandelt und die *HTRA1*-BSP-1-Region (330 bp) mittels PCR amplifiziert. Die in *E. coli* transformierten Subklone wurden anschließend sequenziert und auf ihre Methylierung hin analysiert. Die bis zu sechs analysierten Subklone sind auf der z-Achse abgebildet und der Anteil an methylierten CpG-Dinukleotiden ist in Prozent angegeben.
- c) Von den Melanom-Zelllinien wurde die genomische DNA isoliert, diese mit Bisulfit behandelt und die *HTRA1*-BSP-2-Region (227 bp) mittels PCR amplifiziert. Die in *E. coli* transformierten Subklone wurden anschließend sequenziert und auf ihre Methylierung hin analysiert. Die bis zu sechs analysierten Subklone sind auf der z-Achse abgebildet und der Anteil an methylierten CpG-Dinukleotiden ist in Prozent angegeben.

Die Ergebnisse der Sequenzierung in Abb. 4-10 b) und c) lassen eine relativ geringe DNA-Methylierung am *HTRA1*-Promoter erkennen. Der Bereich *downstream* der Transkriptionsstartstelle (BSP-1) enthält in allen untersuchten Melanom-Zelllinien höchstens 20% methylierte CpG-Dinukleotide. Das entspricht etwa neun methylierten Cytosinen von insgesamt 44 analysierten CpG-Dinukleotiden. Die Region *upstream* der Transkriptionsstartstelle (BSP-2) unterliegt im Durchschnitt einer höheren DNA-Methylierung. Hierbei handelt es sich um vereinzelte Sequenzierungsklone, bei denen eine Methylierung der CpG-Dinukleotide von etwa 40-50% vorliegt (Melanom-Zelllinie Nr. 12, 37, 63 und 103). Die Melanom-Zelllinie Nr.12 sticht aus den übrigen Zelllinien hervor, denn sie weist die geringste *HTRA1*-Genexpression auf (Abb. 4-9) und gleichzeitig ist hier der höchste Grad an DNA-Methylierung vorhanden.

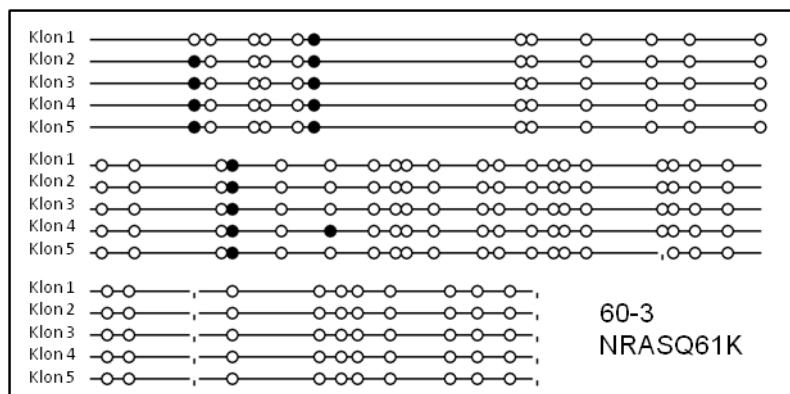
4.2.3 *Melanom-Einzelzellklone mit niedriger HTRA1-Genexpression zeigen eine sehr geringe DNA-Methylierung am HTRA1-Promotor*

Die Methylierungsanalyse der Melanom-Zelllinien zeigt, dass in einigen Zelllinien eine leicht erhöhte DNA-Methylierung an der BSP-2 Region vorliegt. Die sequenzierten Subklone der Melanom-Zelllinie Nr. 103 zeigen z.B. Unterschiede von etwa 50% (Abb. 4-10). Um zu überprüfen, ob sich in der heterogenen Tumormasse der einzelnen Zelllinien vereinzelt Zellklone befinden, welche eine Korrelation zwischen geringer *HTRA1*-Genexpression und hoher DNA-Methylierung zeigen, wurden Einzelzellklone ausgehend von den vorhandenen Melanom-Zelllinien generiert (Antje Sucker, Hautklinik, Universitätsklinikum Essen). Hierbei wurden auch die bereits erwähnten Genotypen der Zelllinien berücksichtigt (WT, BRAF V600E und NRAS Q61K), um *HTRA1* im Zusammenhang mit dem ERK-Signalweg zu analysieren. Von jedem Genotyp wurden mehrere Einzelzellklone kultiviert und ein Einzelklon mit einer verringerten *HTRA1*-Genexpression ausgewählt, um in diesen Zellen die Methylierung des *HTRA1*-Promotors zu untersuchen. Eine verringerte Menge an *HTRA1* wurde u.a. in den Einzelzellklonen Nr. 60-2, 60-3 und 66-5 beobachtet (Abb. 4-15 und Abb. 4-16), daher wurden diese für folgende Experimente verwendet. Das Vorgehen der Methylierungsanalyse entspricht dem im vorherigen Abschnitt. Die Ergebnisse sind in der bereits erwähnten *Lollipop*-Darstellung abgebildet, hierbei sind die einzelnen CpG-Dinukleotide als Kreise dargestellt. Ein weißer Kreis bedeutet ein unmethyliertes Cytosin, ein schwarz gefüllter Kreis repräsentiert eine Methylierung am jeweiligen Cytosin. Ein Strich deutet an, dass an dieser Position während des *Alignments* der Sequenzierreaktionsergebnisse mit der genomischen Sequenz keine Base zugeordnet werden konnte.

a)



b)



c)

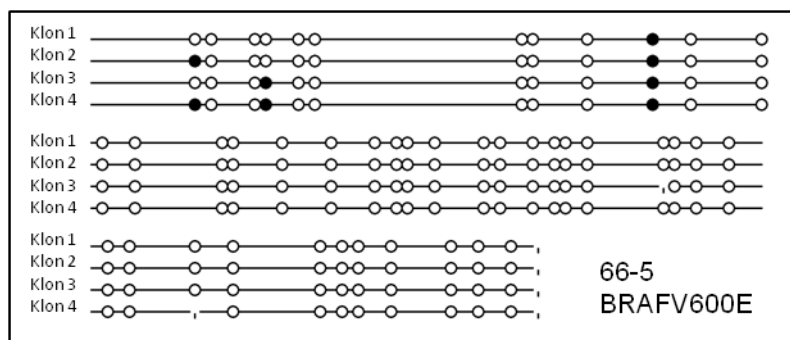


Abb. 4-11: Methylierungsanalyse von Melanom-Einzelzellklonen

Von den drei Melanom-Einzelzellklonen Nr. 60-1 (WT), 60-3 (NRAS Q61K) und 66-5 (BRAF V600E), welche eine verringerte HTRA1-Menge aufweisen, wurde die genomische DNA isoliert, diese mit Bisulfit behandelt und die BSP-1 Region (siehe Abb. 4-10 a) am *HTRA1*-Promotor amplifiziert. Je Zelllinie wurden dann bis zu sechs der in *E. coli* transformierten Subklone sequenziert und auf ihre Methylierung hin analysiert.

Die Analyse der DNA-Methylierung des *HTRA1*-Promotors (BSP-1) zeigt, dass in den drei verwendeten Melanom-Einzelzellklonen eine sehr geringe Methylierung der untersuchten Cytosine vorlag. Die sequenzierten Subklone weisen höchstens vier methylierte CpG-Dinukleotide auf (Abb. 4-11 b), Klon4). Somit lässt sich bei diesen Zelllinien weder ein Zusammenhang zwischen niedriger *HTRA1*-Genexpression und DNA-Methylierung noch zwischen dem Genotyp und der DNA-Methylierung vermuten. In den hier untersuchten Zellklonen ist kein epigenetischer Regulationsmechanismus für die *HTRA1*-Genexpression zu erkennen.

4.3 Charakterisierung der Melanom-Einzelzellklone

Im weiteren Verlauf sollte der Einfluss der heterogenen *HTRA1*-Genexpressionen in den Melanom-Einzelzellklonen charakterisiert werden. Denn die qPCR-Analyse hat deutliche Unterschiede in den Melanom-Zelllinien gezeigt, wobei hier wahrscheinlich nicht die epigenetische Regulation im Vordergrund steht. Unabhängig von dem Mechanismus, der die *HTRA1*-Genexpression reguliert, sind die Auswirkungen auf zellulärer Ebene von großem Interesse. Es gibt Hinweise, welche die *HTRA1*-Genexpression in Verbindung mit der RAF/RAS Signalkaskade bringen. Zum einen wurde in einem Tumor-Mausmodell gezeigt, dass der *knockout* von *HTRA1* bei einem gleichzeitigen Verlust von konstitutiv aktivem KRAS G12V zu einer erhöhten Überlebensrate führt (Prof. Alan Clarke, Universität Cardiff), wobei der Verlust der beiden einzelnen Gene jeweils das Tumorstadium begünstigt und somit die Überlebensrate sinkt. Zusätzlich haben vorherige Daten aus einer Peptid-Bindestudie den C-Terminus der BRAF-Kinase als potentiellen HTRA1-Interaktionspartner identifiziert. Daher stellt sich die Frage, ob eine direkte Interaktion zwischen HTRA1 und den Proteinen aus dem ERK-Signalweg vorhanden ist, die sich dann auf die Aktivität der Signalkaskade bzw. zelluläre Prozesse auswirkt. Es ist bereits publiziert worden, dass proteolytisch aktives HTRA1 die Phosphorylierung von P38, ein Effektorprotein eines weiteren MAPK-Signalweges, beeinflusst (Supanji et al., 2013). Um HTRA1 im Zusammenhang mit dem ERK-Signalweg zu untersuchen, wurden aus den generierten Melanom-Einzelzellklonen Zellklone ausgewählt, welche eine erhöhte *HTRA1*-Genexpression zeigten, sowie solche, deren *HTRA1*-Genexpression dazu vergleichsweise niedrig war. Dieses Kriterium wurde für jeden der drei Genotypen verwendet, so dass insgesamt sechs Zellklone für das weitere experimentelle Vorgehen bestimmt wurden. Dazu wurde die Expression von HTRA1 in allen zur Verfügung stehenden

Melanom-Einzelzellklonen auf RNA- und Protein-Ebene untersucht und verglichen. Eine Übersicht der ausgewählten Zellklone zeigt Tab. 4-1.

Tab. 4-1: Genotyp und *HTRA1*-Expression der ausgewählten Melanom-Einzelzellklone

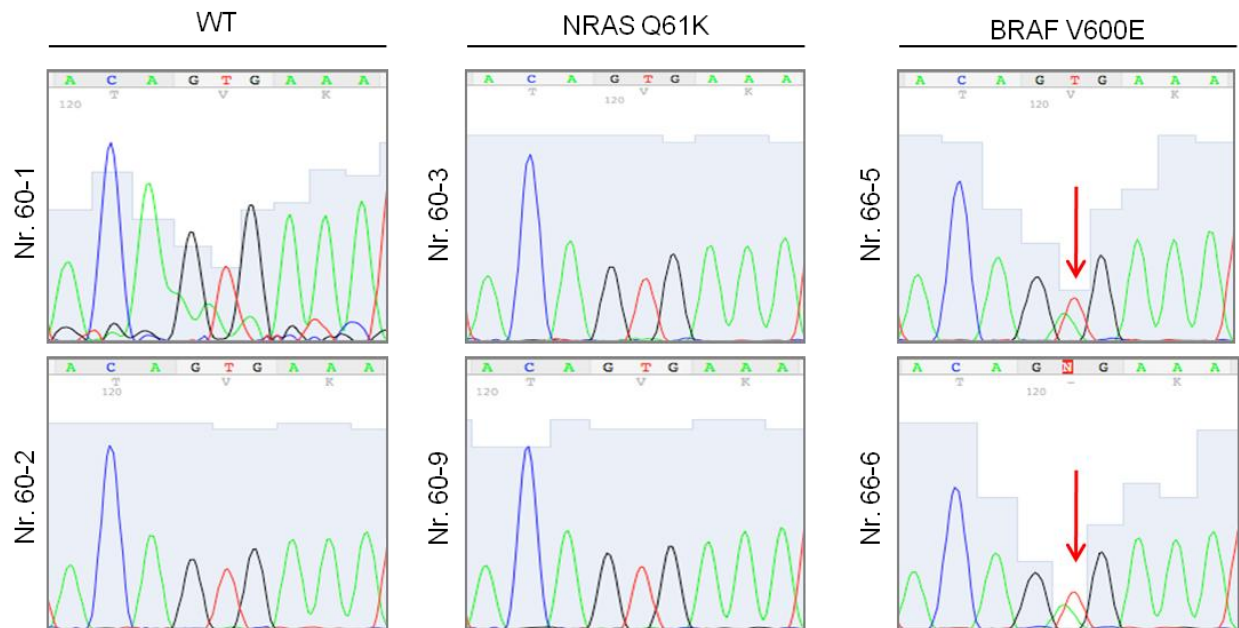
Melanom-Einzelzellklon	Genotyp (Abb. 4-12)	HTRA1 Expression (Abb. 4-15 und Abb. 4-16)
MaMel 60 Nr.1 (60-1)	WT	hoch
MaMel 60 Nr.2 (60-2)	WT	niedrig
MaMel 60 Nr.3 (60-3)	NRAS Q61K	niedrig
MaMel 60 Nr.9 (60-9)	NRAS Q61K	hoch
MaMel 66 Nr.5 (66-5)	BRAF V600E	niedrig
MaMel 66 Nr.6 (66-6)	BRAF V600E	hoch

Die ausgewählten Einzelzellklone wurden im Folgenden auf ihren Genotyp (4.3.1), ihr Expressionsmuster (4.3.4) und auf ihre zellulären Eigenschaften (4.3.2 und 4.3.3) hin untersucht. Dies sollte neben der allgemeinen Charakterisierung bestätigen, dass die generierten Einzelzellklone sich gemäß ihrem Genotyp verhalten.

4.3.1 Bestätigung der Mutationen durch Sequenzierung

Da die generierten Einzelzellklone aus einer heterogenen Tumormasse stammen, wurde der angegebene Genotyp durch Sequenzierung der jeweiligen chromosomalen Bereiche bestätigt. Hierfür wurde aus den Zellen die genomische DNA isoliert und die Regionen, wo die jeweilige Mutation im Gen vorhanden ist, mittels PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden sequenziert und mit dem Programm *4Peaks* analysiert.

a) BRAF



b) NRAS

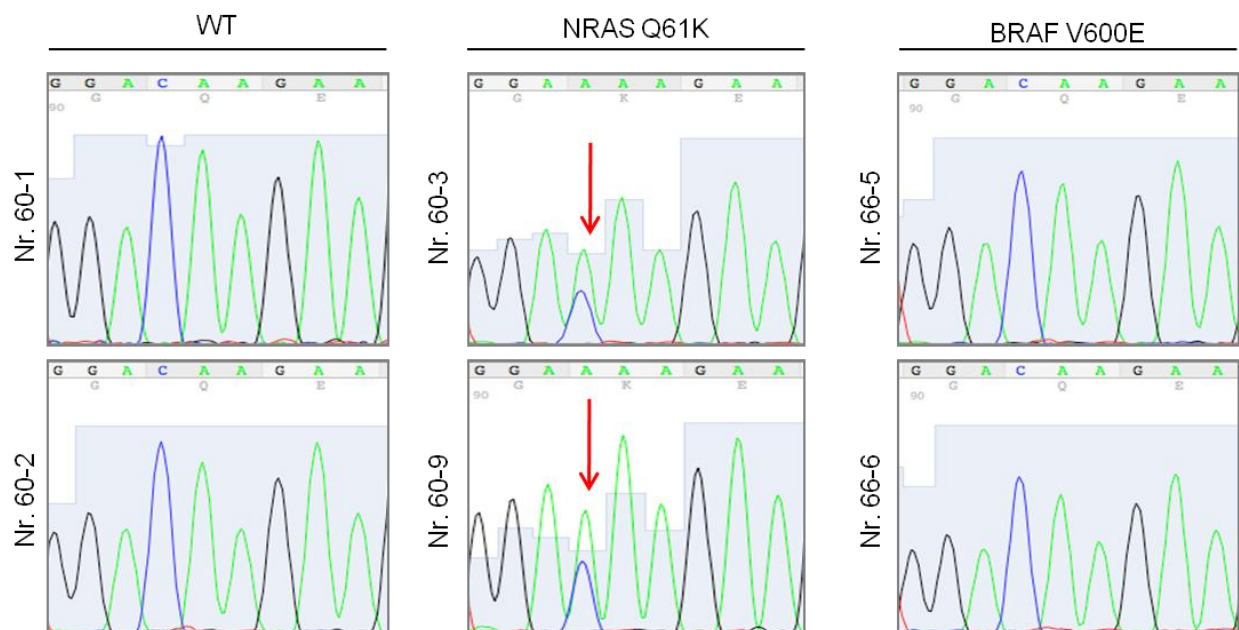


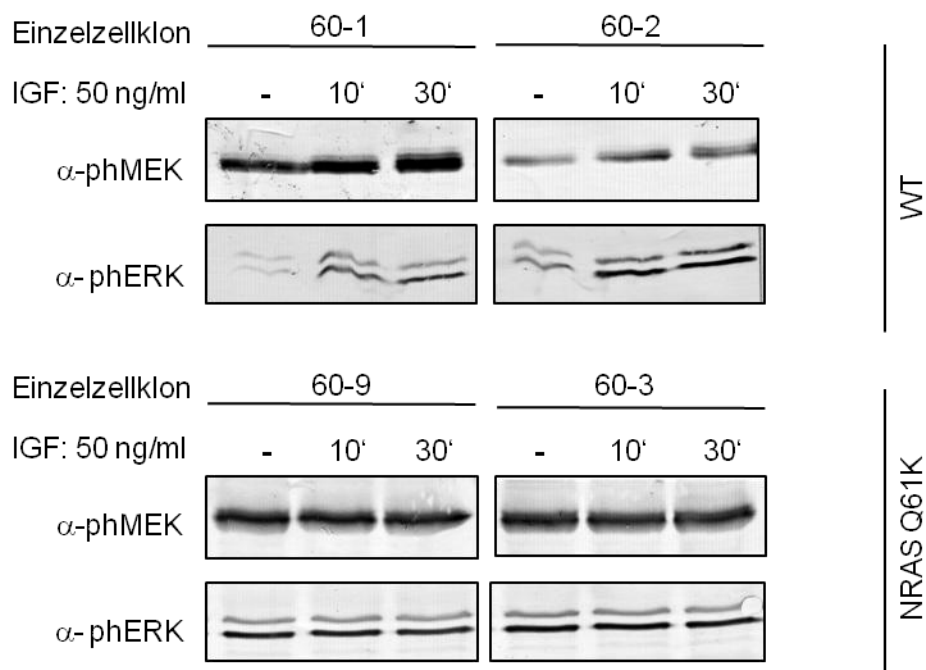
Abb. 4-12: Sequenzierungs-Chromatogramme der *BRAF*- und *NRAS*-Gene der Einzelzellklone

Ausgehend von der genomischen DNA der sechs ausgewählten Melanom-Einzelzellklone wurden PCR-Reaktionen durchgeführt. Für die PCR wurden Primer eingesetzt, die im Exon 15 von *BRAF* bzw. im Exon 1 von *NRAS* lokalisiert sind. Die amplifizierte Regionen wurden sequenziert und der Bereich, wo die jeweilige Mutation vorhanden ist, mit dem Programm *4Peaks* hervorgehoben und dargestellt. a) zeigt eine heterozygote *BRAF* V600E-Mutation in den Einzelzellklonen Nr. 66-5 und 66-6 (roter Pfeil). Die Sequenzierung der *NRAS*-Region ist in b) abgebildet, hier zeigen die Einzelzellklone Nr. 60-3 und 60-9 eine heterozygote *NRAS* Q61K-Mutation (roter Pfeil).

Der Genotyp der sechs Melanom-Einzelzellklone wurde durch die Sequenzierung der genomischen DNA bestätigt. Die Chromatogramme zeigen, dass für *BRAF* in Nr. 66-5 und 66-6 und für *NRAS* in Nr. 60-3 und 60-9 heterozygote Mutationen vorliegen (Abb. 4-12). Die Funktion des jeweiligen Wildtyp-Proteins in diesen Zellen wird durch die konstitutiv, aktiv mutierte Form überlagert. Die WT-Zelllinien zeigen wie erwartet weder eine Veränderung der Nukleotide im *BRAF*- noch im *NRAS*-Gen.

4.3.2 Stimulierung der Melanom-Zelllinien mittels IGF

Ein weiteres Charakteristikum der unterschiedlichen Genotypen ist ihre Aktivität bezogen auf den ERK-Signalweg. Eine hohe Aktivität spiegelt sich u.a. in einer erhöhten Phosphorylierung der beiden Kinasen MEK und ERK wieder. Um zum Einen die Aktivität und zum Anderen die Aktivierbarkeit des Signalweges zu untersuchen, wurden die Melanom-Zelllinien mit dem humanen insulinähnlichem Wachstumsfaktor IGF behandelt. Die Signalkaskade wurde durch den Entzug von Serum im Zellkulturmedium zuvor herunterreguliert und nach 24 Stunden durch die Zugabe von IGF wieder aktiviert. Die Zellen wurden dann nach 10 und 30 Minuten lysiert und der proteinhaltige Überstand auf ein SDS-Gel aufgetragen und mittels Immundetektion analysiert.



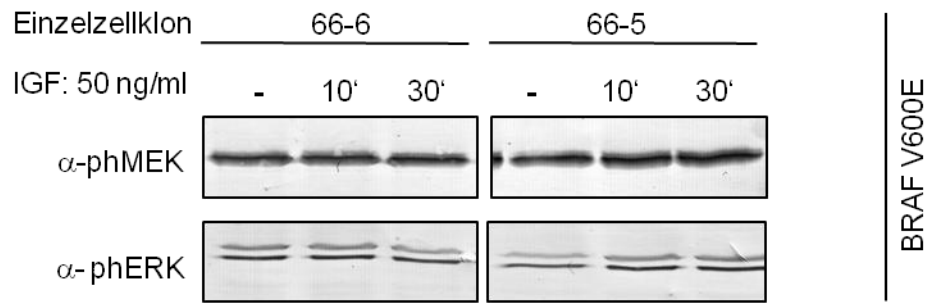


Abb. 4-13: Immundetektion von phospho-MEK und phospho-ERK nach IGF-Behandlung

Die Melanom-Einzelzellklone wurden für 24 h ohne Serum kultiviert (-). Nach der Zugabe von IGF (50 ng/ml) wurden die Zellen jeweils nach 10 und 30 Minuten geerntet, der proteinhaltige Überstand auf ein SDS-Gel aufgetragen und das Maß der Phosphorylierungen von MEK und ERK über Immundetektion analysiert. Oben: WT, mitte: BRAF V600E, unten: NRAS Q61K

Die Immundetektion mit α -phospho-MEK und α -phospho-ERK zeigt (Abb. 4-13), dass verglichen zu den WT-Zelllinien in den Zelllinien mit der Mutation im *BRAF*- und *NRAS*-Gen eine erhöhte basale Aktivität des ERK-Signalweges vorlag. Außerdem ließen sich wie erwartet durch die Zugabe von IGF lediglich die WT-Zelllinien aktivieren. Die übrigen Zelllinien tragen eine Mutation, die für eine konstitutiv aktive Signalkaskade sorgt, daher konnten sie nicht noch zusätzlich stimuliert werden. Die unterschiedlichen HTRA1-Expressionen der Einzelzellklone (Abb. 4-16) scheinen keinen Einfluss auf die Aktivierbarkeit der beiden Kinasen zu haben, wohingegen die basale Phosphorylierung von MEK in dem HTRA1 höher exprimierenden WT-Einzelzellklon (Nr. 60-1) deutlich gesteigert ist im Vergleich zum HTRA1 niedrig exprimierenden WT-Einzelzellklon (Nr. 60-2). Zudem wurde in weiteren Immundetektionen tendenziell eine HTRA1-abhängige erhöhte Phosphorylierung von ERK beobachtet (nicht gezeigte Daten), jedoch konnten keine Bedingungen etabliert werden, welche diese Beobachtung reproduzieren ließen. Neben einer veränderten Phosphorylierung der beiden Kinasen wurden daher auch vergleichbare Phosphorylierungs-Level detektiert (Abb. 4-37).

4.3.3 Hemmung der BRAF V600E Zellen mittels PLX4032

Die konstitutiv aktive Form BRAF V600E kann über den spezifischen Inhibitor PLX4032 (Vemurafenib) gehemmt werden. Ein Melanom-Einzelzellklon jeden Genotyps wurde mit unterschiedlichen PLX4032 Konzentrationen behandelt, um so die spezifische Hemmung des BRAF V600E Proteins zu bestätigen. Hierfür wurden die Zellen ausgesät und nach 24 Stunden mit PLX4032 behandelt, die Zellen lysiert und der proteinhaltige Überstand auf ein SDS-Gel aufgetragen und mittels Immundetektion analysiert.

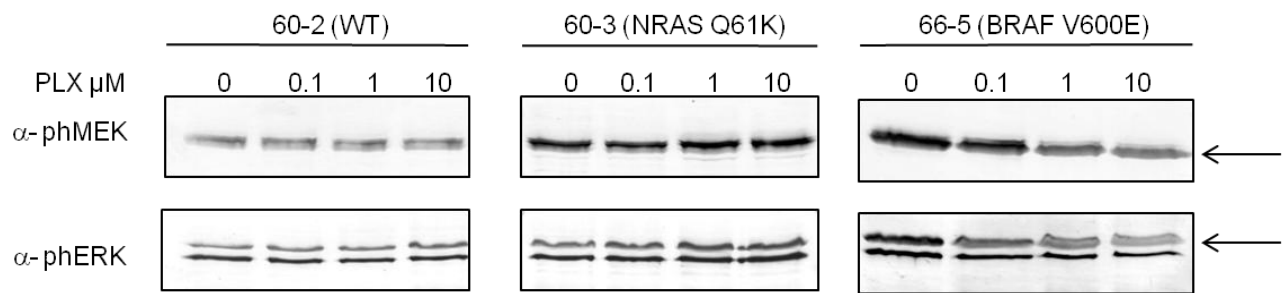


Abb. 4-14: Immundetektion von phospho-MEK und phospho-ERK nach PLX-Behandlung

Die Melanom-Einzelzellklone wurden für 24 h kultiviert. Nach der Zugabe von unterschiedlichen PLX4032-Konzentrationen (0, 0,1, 1,0, 10 μM) wurden die Zellen nach 4,5 (WT und NRAS Q61K) bzw. 2,5 h (BRAF V600E) geerntet, der proteinhaltige Überstand auf ein SDS-Gel aufgetragen und das Maß der Phosphorylierungen von MEK und ERK über Immundetektion analysiert.

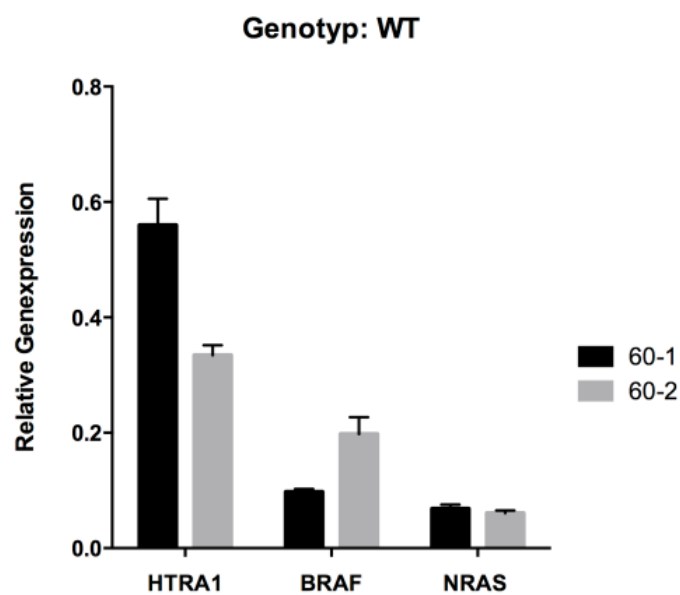
Die Immundetektion mit α-phospho-MEK und α-phospho-ERK zeigt (Abb. 4-14), dass die Behandlung mit PLX4032 lediglich in der BRAF V600E-Zelllinie zu einer Verringerung der phosphorylierten MEK- und ERK-Proteine führte. Die WT- und NRAS Q61K-Zelllinien zeigten keine Veränderung in der Phosphorylierung von MEK oder ERK.

Die jeweiligen Behandlungen mit IGF und PLX4032 bestätigen den Genotyp der Einzelzellklone auf zellulärer Ebene. Die ausgewählten Zellklone zeigen die erwartete Aktivierbarkeit bzw. Hemmung der ERK-Signalkaskade über eine veränderte Phosphorylierung von MEK und ERK und können somit für die nachfolgenden Experimente verwendet werden.

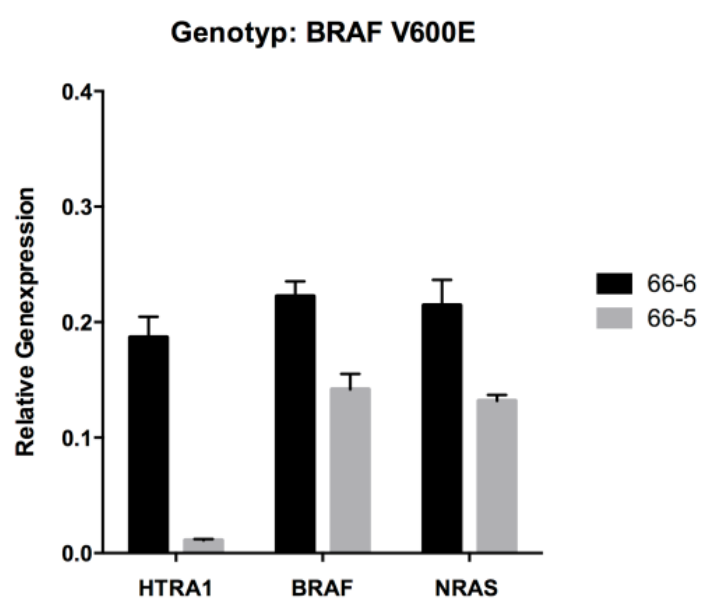
4.3.4 Genexpression und Proteinlevel von *HTRA1*, *BRAF* und *NRAS* in den Melanom-Einzelzellklonen

Die Genexpressionen von *HTRA1* und der beiden Gene *BRAF* und *NRAS* wurden mittels qPCR in den sechs ausgewählten Melanom-Einzelzellklonen ermittelt. Hierfür wurde die RNA isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR die relativen Genexpressionen ermittelt.

a)



b)



c)

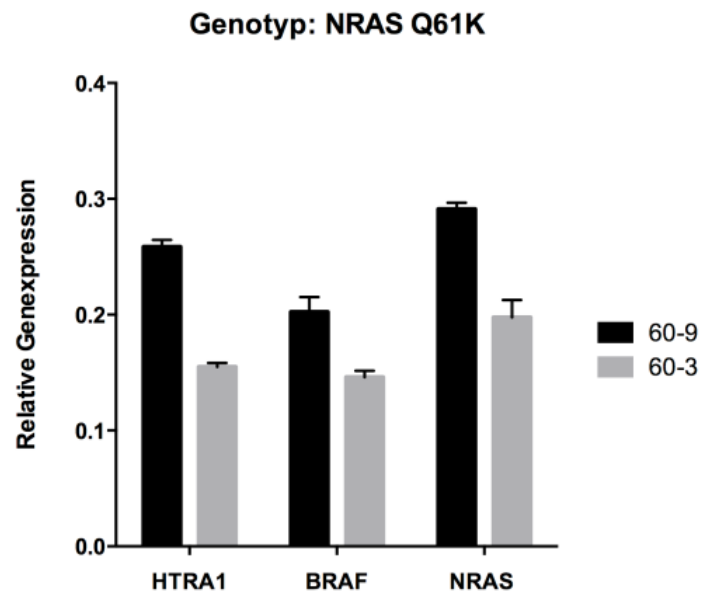


Abb. 4-15: Genexpression von *HTRA1*, *BRAF* und *NRAS* in Melanom-Einzelzellklonen

Der Gehalt an mRNA von *HTRA1*, *BRAF* und *NRAS* wurden mittels qPCR bestimmt und zur mRNA der housekeeper-Gene *GAPDH* und *RibProt* relativiert. Die Melanom-Einzelzellklone unterscheiden sich in ihrem Genotyp: a) WT, b) *BRAF* V600E, c) *NRAS* Q61K). Die Eigenschaften der ausgewählten Zellklone sind der Tab. 4-1 zu entnehmen.

Die Daten der qPCR-Analyse zeigen eine unterschiedliche Genexpression von *HTRA1* in den jeweils zwei zu vergleichenden Zelllinien der verschiedenen Genotypen. Dabei waren die *HTRA1*-Genexpression in der Zelllinie 60-1 (WT) und 60-9 (*NRAS* Q61K) jeweils im Vergleich zu 60-2 und 60-3 nicht so stark erhöht wie bei den *BRAF* V600E-Zelllinien 66-6 und 66-5. Hier war der größte Unterschied auf Transkriptionsebene zu erkennen. Die relativen Genexpressionen von *BRAF* und *NRAS* zeigten bei den Zelllinien mit der *BRAF*- bzw. *NRAS*-Mutation einen vergleichbaren Wert. Hierbei war eine tendenziell positive Korrelation verglichen zur *HTRA1*-Genexpression zu beobachten (Abb. 4-15 b) und c)). Liegt keine Mutation in dem *BRAF*- oder *NRAS*-Genen vor, sinkt der Wert der relativen Genexpression dieser Gene auf etwa 0,1 (Abb. 4-15 a)).

Da eine Interaktion auf Proteinebene stattfinden könnte, wurden die Proteine *HTRA1*, *BRAF* und *NRAS* in den sechs Melanom-Einzelzellklonen mittels Immundetektion nachgewiesen. Es sollte zudem überprüft werden, ob die *BRAF*- oder *NRAS*-Proteine Substrate für *HTRA1* darstellen und somit durch die Protease abgebaut werden können. Eine mögliche

HTRA1-abhängige Verringerung von BRAF oder NRAS kann durch die Immundetektion visualisiert werden. Außerdem wurde nochmals die Mutation von BRAF mittels eines V600E-spezifischen Antikörpers überprüft. Das lösliche Proteinextrakt der Zelllinien wurde dafür auf ein SDS-Gel aufgetragen und die Proteine mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen.

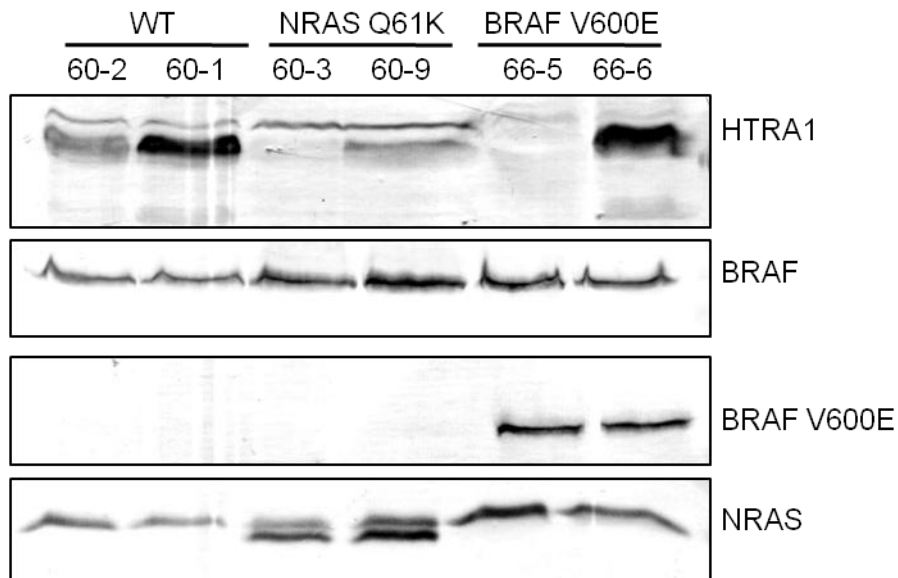


Abb. 4-16: Immundetektion von HTRA1, BRAF, BRAF V600E und NRAS in Melanom-Einzelzellklonen

Jeweils 100 µg lösliches Proteinextrakt der Melanom-Einzelzellklone 60-2, 60-1, 60-3, 60-9, 66-5 und 66-6 wurden mit SDS-Ladepuffer versetzt und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die Proteine HTRA1, BRAF, BRAF V600E und NRAS wurden mittels Immundetektion sichtbar gemacht.

Die Immundetektion in Abb. 4-16 ließ zum einen unterschiedliche Expressionen von HTRA1 auf Proteinebene erkennen (obere Reihe). Die beiden ausgewählten Zellklone jeden Genotyps zeigten deutliche Unterschiede von HTRA1 auf Proteinebene, wohingegen die Proteinmengen von BRAF und NRAS nicht erheblich voneinander abweichen. Die BRAF V600E Mutation war eindeutig auf Proteinebene zu sehen. Die gezeigte Abbildung lässt zwar geringe Unterschiede in der Proteinmenge erkennen, jedoch waren diese in unterschiedlichen Experimenten tendenziell nicht gleichbleibend zu beobachten. Anhand dieser Ergebnisse lässt sich nicht eindeutig schlussfolgern, ob BRAF- oder NRAS-Proteine durch HTRA1 abgebaut werden können. Es besteht ebenfalls die Möglichkeit, dass sich BRAF und NRAS Mengen abhängig von der Zelldichte unterscheiden. Bei der Detektion von NRAS sind in den NRAS Q61K Zelllinien 60-3 und 60-9 zwei Proteinbanden sichtbar. Da es sich um eine heterozygote Mutation handelt, sind zwei NRAS-Proteine mit unterschiedlichem Laufverhalten im SDS-Gel zu erkennen. Bei der oberen Bande handelt es sich um das

Wildtyp NRAS-Protein und die untere Bande stellt das konstitutiv aktive NRAS Q61K-Protein dar. Dadurch lässt sich auch hier auf Proteinebene eine bestehende Mutation nachweisen.

4.3.5 Lokalisation von HTRA1 in Melanom-Einzelzellklonen

Die Melanom-Einzelzellklone sollten auch auf ihre intrazelluläre HTRA1-Lokalisation hin untersucht werden. Dazu wurde zunächst der vorhandene HTRA1-Antikörper für Immunfluoreszenzfärbungen verwendet und überprüft, ob dieser die Unterschiede in der HTRA1-Expression sichtbar macht. Zur Überprüfung des Antikörpers wurden die BRAF V600E Melanom-Einzelzellklone verwendet, da diese den größten Unterschied in der HTRA1-Expression aufweisen.

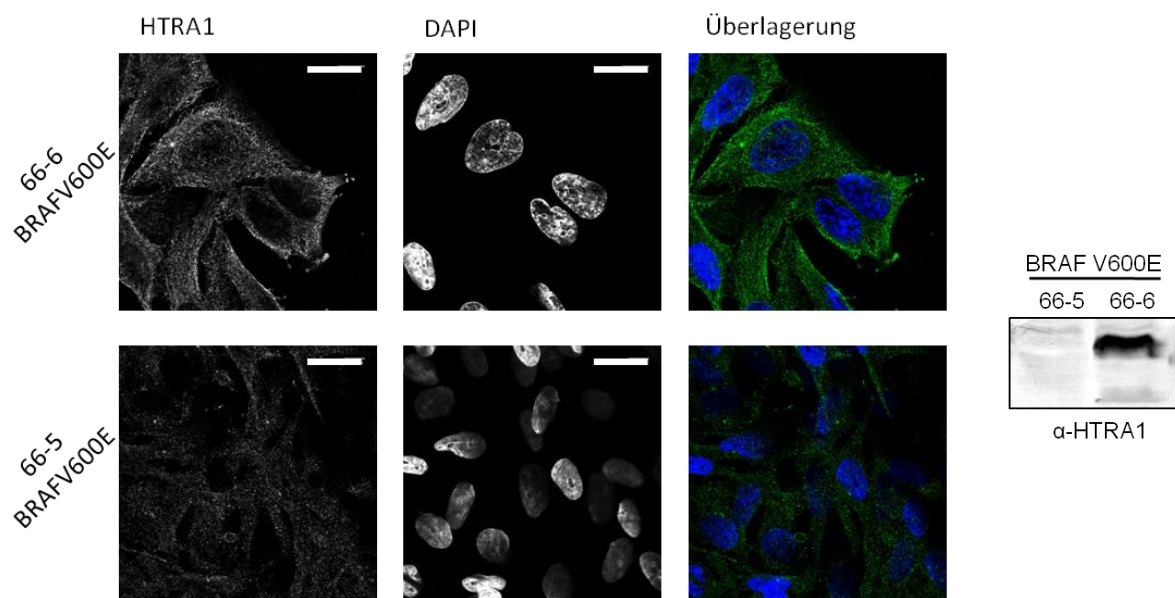


Abb. 4-17: Immunfluoreszenzfärbung von HTRA1 in BRAF V600E Melanom-Einzelzellklonen

Die BRAF V600E Melanom-Einzelzellklone Nr. 66-6 und 66-5 wurden fixiert und der Zellkern mit DAPI gefärbt (blau), HTRA1 mit einem HTRA1-Antikörper und einem Alexa-488 gekoppelten Sekundärantikörper (grün). Die Untersuchung der Zellen erfolgte mittels konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie. Maßstab: 20 µm. Zur Kontrolle wurden Proteinlysate der jeweiligen Zellen mittels der Immundetektion mit einem HTRA1-Antikörper analysiert (rechts).

In der Abb. 4-17 ist deutlich zu erkennen, dass sich die beiden Melanom-Einzelzellklone 66-5 und 66-6 in ihrer HTRA1-Expression unterscheiden. Ebenso wie in der Immundetektion ließ sich in dem Einzelklon 66-6 eine deutlich höhere Menge an HTRA1 nachweisen. Somit kann der Antikörper für Immunfluoreszenzfärbungen von HTRA1 eingesetzt werden.

Bisher ist eine an Tubulin lokalisierte Verteilung von HTRA1 beschrieben worden (Chien et al., 2009). In der Abb. 4-17 ist jedoch eine punktförmige Verteilung von HTRA1 zu erkennen.

Um zu überprüfen, ob die HTRA1-Verteilung eher von unterschiedlichen Gewebetypen abhängig ist oder über die Mutationen von BRAF bzw. NRAS beeinflusst wird, wurde in den Einzelzellklonen die Lokalisation von HTRA1 mittels Immunfluoreszenzfärbung analysiert. Hierfür wurden die Einzelzellklone mit einer erhöhten HTRA1-Expression kultiviert, auf Deckgläschen ausgesät und nach der Fixierung mit Hilfe des HTRA1-Antikörpers gefärbt.

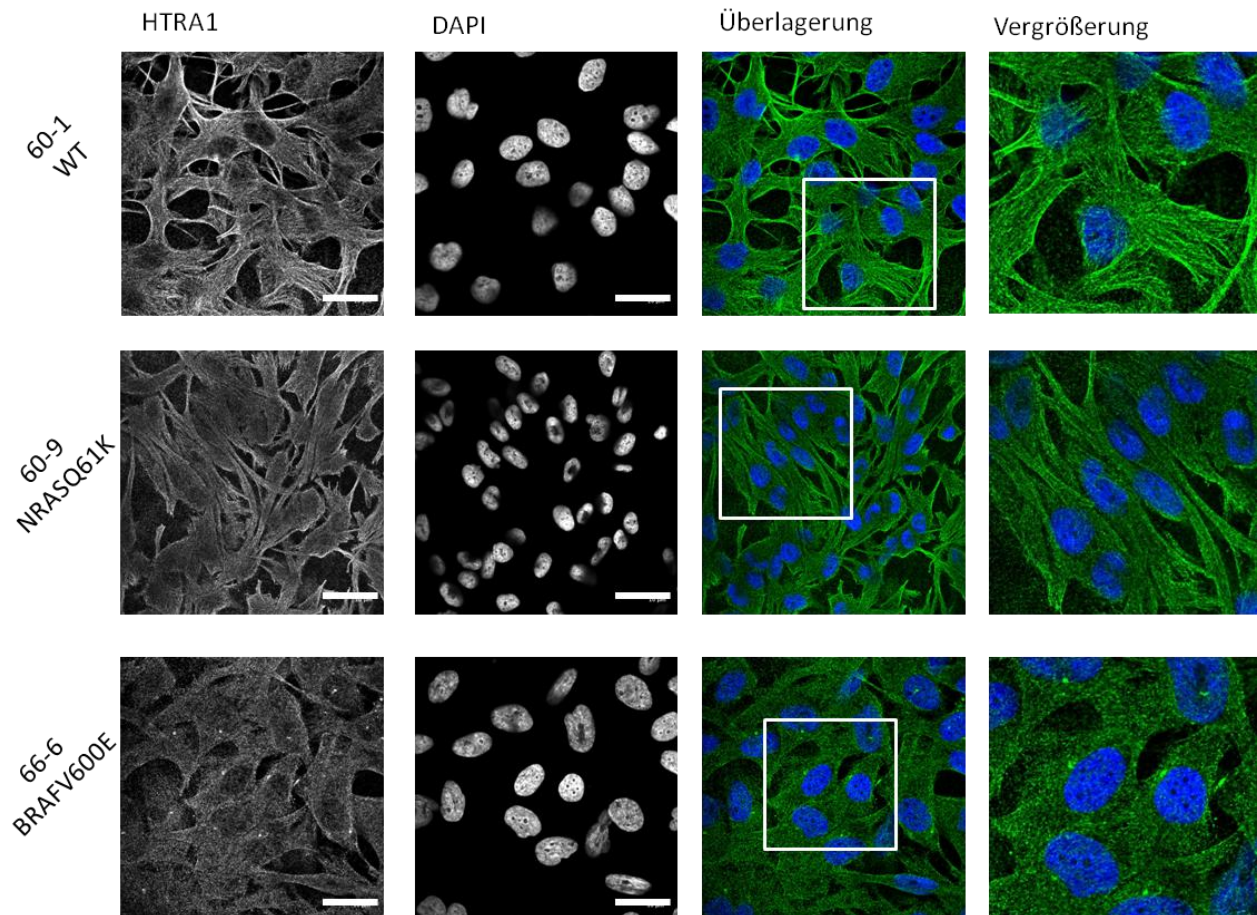


Abb. 4-18: Lokalisation von HTRA1 in Melanom-Einzelzellklonen

Die Melanom-Einzelzellklone Nr. 60-1, 60-9 und 66-6 mit erhöhter HTRA1-Expression wurden auf Deckgläschen fixiert und anschließend gefärbt. Der Zellkern wurde mit DAPI gefärbt (blau), HTRA1 mit einem HTRA1-Antikörper und einem Alexa-488 gekoppelten Sekundärantikörper (grün). Die Untersuchung der Zellen erfolgte mittels konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie. Die Vergrößerung zeigt den weiß umrandeten Bereich der Überlagerung. Maßstab: 20 µm.

Die Immunfluoreszenzfärbungen in Abb. 4-18 zeigen eine Genotyp-abhängige Lokalisation von HTRA1. In den WT-Melanomzellen war eine faserähnliche Verteilung von HTRA1 zu beobachten (oben). Die BRAF V600E-Melanomzellen zeigten eine diffuse und punktförmige Verteilung von HTRA1 (unten). In den NRAS Q61K-Melanom-Zellen waren zum einen

faserähnliche Strukturen von HTRA1 an der Zellmembran und eine punktförmige Verteilung von HTRA1 im Zytoplasma zu erkennen (mitte).

4.3.6 Melanom-Einzelzellklon mit niedriger HTRA1-Expression zeigt eine erhöhte Polyploidie

Eine niedrige *HTRA1*-Genexpression ist mit einer Zunahme von Chromosomenamplifikationen in Verbindung gebracht worden (Dissertation N. Schmidt). Das vermehrte Auftreten von Polyploidie wurde in embryonalen Mausfibroblasten sowie in Kolonkarzinomzellen nachgewiesen, in denen die *HTRA1*-Genexpression ausgeschaltet bzw. herunterreguliert worden war. Um zu überprüfen, ob auch in Melanomzellen eine Veränderung der Chromosomenanzahl mit der *HTRA1*-Menge korreliert, wurde der DNA-Gehalt in den beiden WT-Melanom-Einzelzellklonen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Der Einzelzellklon Nr. 60-1 weist eine höhere *HTRA1*-Menge auf als der Einzelzellklon Nr. 60-2 (Abb. 4-16). Durch den vorherigen Entzug von Serum im Kulturmedium wurden die Zellen in der G0-Phase des Zellzyklus synchronisiert. Durch die erneute Zugabe von Serum nach 40 h wurde der synchrone Wiedereintritt in die G1-Phase induziert. Um Veränderungen im DNA-Gehalt zu untersuchen wurden die Zellen nach unterschiedlichen Zeitpunkten fixiert und mit Propidiumiodid gefärbt.

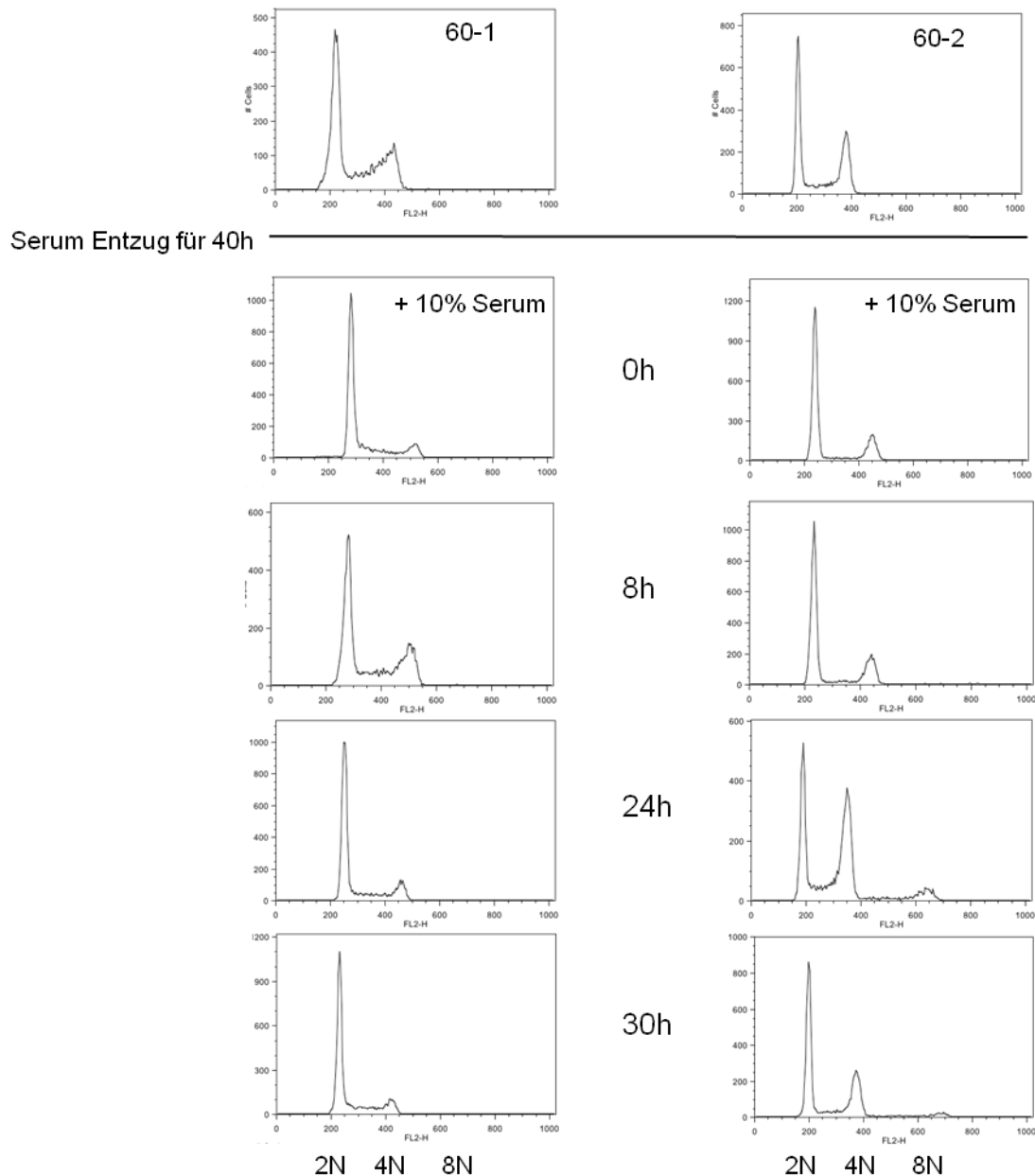


Abb. 4-19: FACS-Analyse von WT-Melanomzellen nach Synchronisierung durch Serumentzug

Den WT-Melanom-Einzelzellklonen Nr. 60-1 (links) und 60-2 (rechts) wurde das Serum entzogen. Nach 40 h wurde frisches Serum hinzugegeben und die Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten mittels Ethanol fixiert und mit Propidiumiodid gefärbt. Der DNA-Gehalt der einzelnen Proben wurde mit Hilfe eines Durchflusszytometers bestimmt. 2N = doppelter Chromosomensatz, 4N = vierfacher Chromosomensatz, 8N = achtfacher Chromosomensatz.

Die Durchflusszytometrie in Abb. 4-19 zeigt bei beiden Zelllinien eine Verringerung des vierfachen Chromosomensatzes nach dem Serumentzug für 40 Stunden (Zeitpunkt 0h) verglichen zu den Kontrollen (obere Reihe), was dafür spricht, dass die Zellen in der G0-Phase arretiert wurden. Ein vierfacher Chromosomensatz war im Verlauf des Zellzyklus

als Folge der DNA-Duplikation vorhanden. Die Melanom-Zelllinie Nr. 60-2 mit einer verringerten HTRA1-Expression zeigte hier eine deutliche Erhöhung des verdoppelten DNA-Gehaltes (4N) nach 24 Stunden. Neben dem erhöhten vierfachen Chromosomensatz war auch ein Anteil an achtfachem Chromosomensatz zu erkennen. Die beobachtete Polyploidie liefert einen weiteren Hinweis dafür, dass HTRA1 auch in Melanomzellen für die Chromosomenamplifikation eine Rolle spielen könnte.

4.4 *In vitro* Charakterisierung der HTRA1-RAF Interaktion

Die Genexpressionsanalyse (Abb. 4-15) und die durchgeführten Immundetektionen (Abb. 4-16) zeigen keine Korrelation zwischen der Expression von HTRA1 und BRAF oder NRAS. Da jedoch der C-Terminus von BRAF als potentieller Bindepartner identifiziert wurde, wurde im Folgenden diese mögliche Interaktion *in vitro* näher charakterisiert. Dafür wurden zwei relevante Domänen des RAF-Proteins, über die eine Interaktion stattfinden könnte, in *E. coli* überexprimiert und die rekombinanten Proteine gereinigt. Es wurde zum einen die etwa 9 kDa große RAS-Bindedomäne (RBD) von CRAF und die Kinase-Domäne von BRAF mit einem Molekulargewicht von 30 kDa gereinigt. Mit Hilfe dieser an GST fusionierten Proteine und mittels GST-Pulldown Experimenten sollte eine potentielle Interaktion mit der Protease HTRA1 untersucht werden.

4.4.1 Reinigung von GST-CRAF-RBD

Für die Reinigung wurde GST-RBD zunächst in *E. coli* BL21(DE3)pLysS-Zellen überexprimiert und das lösliche Fusions-Protein mittels GST-Agarose Beads aus dem Bakterienlysate affinitätsgereinigt. Zwischen dem GST-Tag und der RBD befindet sich eine Thrombinschnittstelle, daher wurde für die Abspaltung des GST-Tags das eluierte Protein mit Thrombin inkubiert. Um den Erfolg der Reinigung zu kontrollieren, wurden im Verlauf der Reinigung Aliquots abgenommen und mit Hilfe der SDS-PAGE und anschließender Coomassie Blau-Färbung analysiert. In Abb. 4-20 ist exemplarisch der Verlauf einer RBD-Reinigung dargestellt.

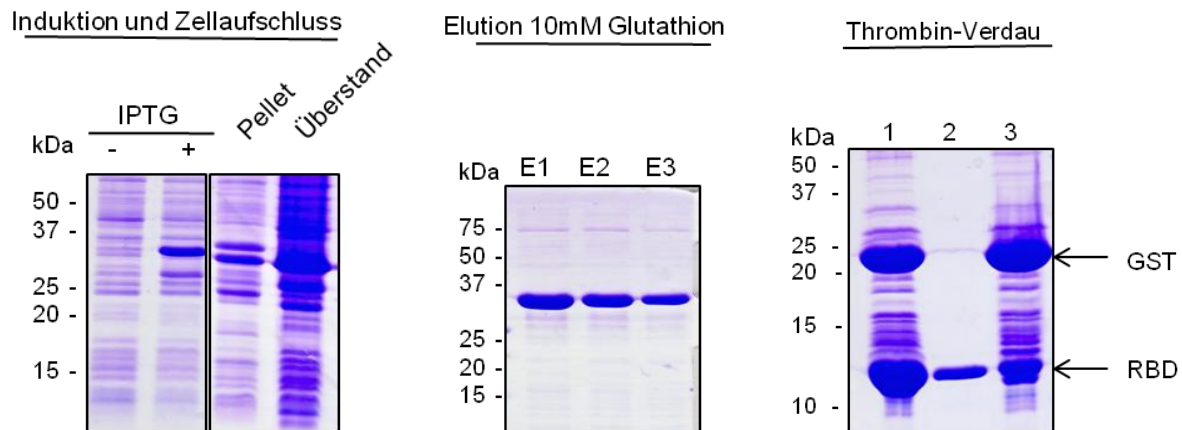


Abb. 4-20: Reinigung von GST-RBD

GST-RBD wurde in *E. coli* BL21(DE3)pLysS-Zellen exprimiert. Die Protein wurde mittels GST-Agarose Beads affinitätsgereinigt. Die drei Elutionsschritte wurden zusammengeführt (mitte, E1-E3) und die Abspaltung des GST-Proteins erfolgte durch eine Inkubation mit Thrombin über Nacht bei 4°C (rechts, Probe 1). Die RBD wurde mittels Einkonzentrierungssäulchen mit einem *cutoff* von 10 kDa einkonzentriert (rechts, Probe 2) und dadurch vom GST-Protein und Thrombin getrennt (rechts, Probe 3). Die Abbildung zeigt die SDS-PAGE-Analyse der entnommenen Aliquots.

Die Abb. 4-20 zeigt die effektive Expression und Affinitätsreinigung von GST-RBD. Es war eine deutliche zusätzliche Proteinbande nach der IPTG-Zugabe bei etwa 35 kDa zu sehen. Nach dem Zellaufschluss befindet sich der größte Teil des Proteins im Überstand. Das Protein wurde nach der Inkubation mit GST-Agarose Beads über drei Elutionsschritte mit 10 mM Glutathion eluiert. Die Elutionen waren weitgehend frei von Verunreinigungen und Abbaubanden, so dass die zusammengeführten Elutionsschritte für die folgenden Experimente verwendet wurden. Von einem Anteil des GST-RBD Proteins wurde der GST-Tag mit Hilfe von Thrombin entfernt, sodass die RBD ohne GST-Tag vorlag (Abb. 4-20, Thrombin-Verdau, Probe 2).

4.4.2 Reinigung von GST-BRAF-Kinase

Für die Reinigung der GST-Kinase-Domäne wurde diese in *E. coli* Rosetta2-Zellen überexprimiert und das lösliche Fusions-Protein mittels GST-Agarose Beads aus dem Bakterienlysate affinitätsgereinigt. Um den Erfolg der Reinigung zu kontrollieren, wurden im Verlauf der Reinigung Aliquots abgenommen und mit Hilfe der SDS-PAGE und anschließender Coomassie Blau-Färbung analysiert. In Abb. 4-21 ist exemplarisch der Verlauf einer Reinigung der GST-BRAF-Kinase dargestellt.

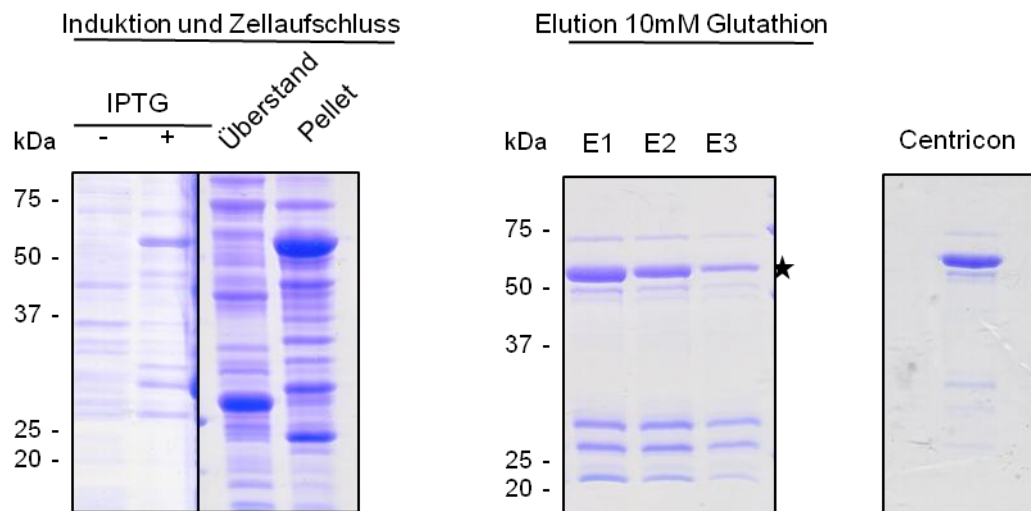


Abb. 4-21: Reinigung der BRAF-Kinase-Domäne

Die GST-BRAF-Kinase wurde in *E. coli* Rosetta 2-Zellen exprimiert. Die Affinitätsreinigung des Proteins wurde mittels Inkubation mit GST-Agarose Beads vorgenommen. Die Abbildung zeigt die SDS-PAGE-Analyse der entnommenen Aliquots, (E= Elution). Die Markierung (Stern) zeigt die GST-BRAF-Kinase. Die Centricon-Probe entspricht einem Aliquot der einkonzentrierten Elutionsschritte.

Die Abb. 4-21 zeigt die Expression und Affinitätsreinigung der GST-BRAF-Kinase-Domäne. Es war eine zusätzliche Proteinbande nach der IPTG-Zugabe bei etwa 60 kDa zu sehen. Nach dem Zellaufschluss war der größte Teil des Proteins im Zellpellet und das im Überstand enthaltene Protein ist auf dem SDS-Gel nicht zu identifizieren. Die drei Elutionen zeigen jedoch, dass die Kinase-Domäne auch im Überstand vorhanden war. Die Elutionen beinhalten noch zusätzlich drei Abbaubanden von etwa 25 kDa. Diese konnten jedoch durch Einkonzentrierungssäulchen mit einem *cutoff* von 30 kDa größtenteils entfernt werden (Abb. 4-21, Centricon).

4.4.3 HTRA1 interagiert mit CRAF-RBD und der BRAF-Kinase-Domäne *in vitro*

Um zu untersuchen, ob HTRA1 an die rekombinant gereinigten RAF-Proteine *in vitro* binden kann, wurde ein GST-Pulldown Assay etabliert. Die Abb. 4-22 gibt einen schematischen Überblick des *in vitro* GST-Pulldown Assays.

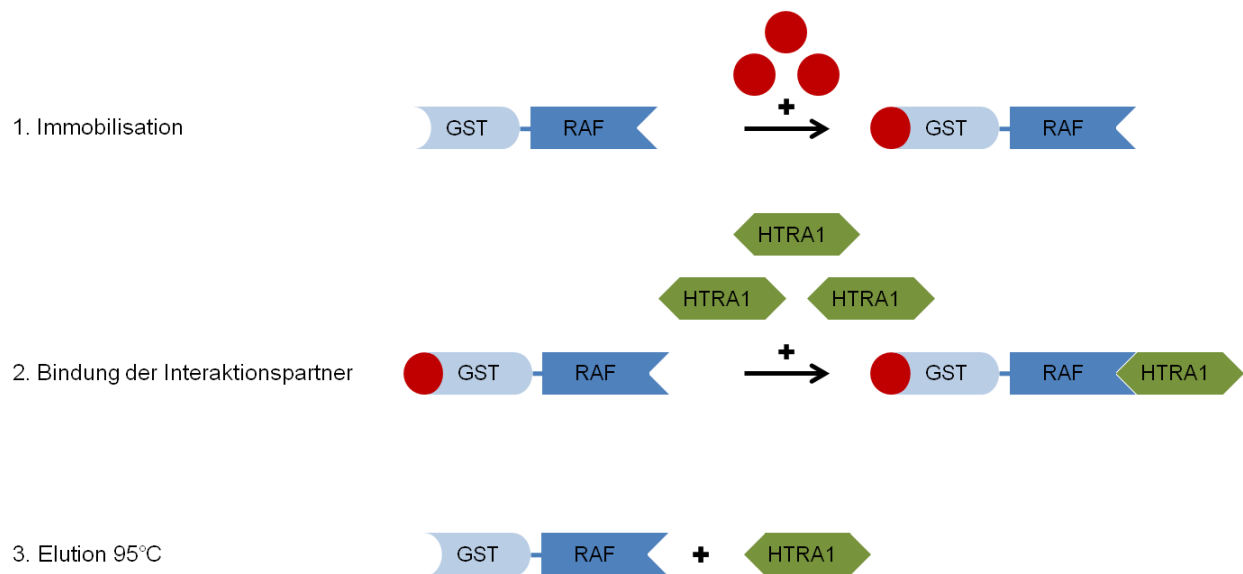


Abb. 4-22: Schematische Darstellung des *in vitro* GST-Pulldown Assays

Der GST-Pulldown Assay beginnt mit der Immobilisation der GST-RAF Fusionsproteine an GST-Agarose Beads (rote Kreise), es folgt die Zugabe eines potentiellen Interaktionspartners (HTRA1 Δ macSA), drei Waschschrte und die Elution der gebundenen Proteine bei 95°C.

Dabei wurde proteolytisch inaktives rekombinantes HTRA1 Δ mac (HTRA1 Δ mac S328A) jeweils mit der RBD oder der Kinase-Domäne bei 37°C inkubiert. Bei der inaktiven Form von HTRA1 ist das katalytisch aktive Serin durch ein Alanin ersetzt worden. Die rekombinanten RAF-Proteine wurden zuvor für eine Stunde an GST-Agarose Beads immobilisiert. Von den einzelnen Schritten wurden Proben entnommen und mit Hilfe der SDS-Page und anschließender Coomassie-Blau Färbung konnte überprüft werden, ob HTRA1 an die immobilisierten RAF-Proteine gebunden hat. Um die gebundenen Proteine von den Beads zu lösen, wurden diese für die Elution bei 95°C in SDS-Probenpuffer erhitzt.

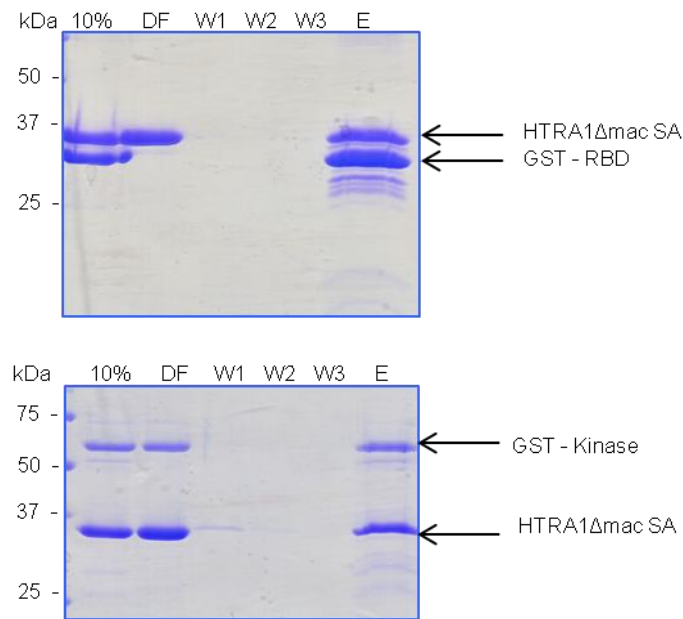


Abb. 4-23: *In vitro* Interaktion von HTRA1ΔmacSA mit immobilisierten RAF-Proteinen

HTRA1ΔmacSA wurde jeweils mit der immobilisierten GST-RBD (oben) und GST-Kinase-Domäne (unten) bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Überstand entnommen (DF) und die GST-Agarose Beads mehrmals mit Puffer gewaschen (W1-W3). Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte bei 95°C. Die Proben der einzelnen Schritte wurden zur Überprüfung auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die Reihenfolge der Proben (von links nach rechts): 10% der Gesamtprobe vor der Inkubation, Überstand nach der Immobilisation mittels GST-Agarose Beads, Waschschritte 1-3, 50% der gesamten Elution.

Die SDS-Gele in Abb. 4-23 zeigen, dass sich rekombinantes HTRA1 mit Hilfe der GST-RAF-Proteine aus dem Reaktionsansatz präzipitieren ließ. Der Durchfluss aus der Inkubation mit RBD war frei von GST-RBD (oberes SDS-Gel), somit ist die gesamte Menge an RBD-Protein immobilisiert worden, wohingegen die Kinase-Domäne nicht vollständig an die GST-Agarose Beads gebunden hatte (unteres SDS-Gel) und folglich auch in der Elution weniger Protein enthalten war. Da HTRA1 in beiden Fällen im Durchfluss vorhanden war, kann vermutet werden, dass die Interaktion durch die Menge der jeweiligen RAF-Proteine oder auch eine schwache Bindung limitiert wurde.

In dem GST-Pulldown Assay von HTRA1ΔmacSA und der Kinase-Domäne von BRAF sind in der Elution auch die Abbaubanden von der Kinase-Domäne zu erkennen (Abb. 4-23, unteres SDS-Gel). Diese enthalten womöglich den GST-Tag und binden daher an die GST-Agarose Beads. Um zu überprüfen, ob HTRA1ΔmacSA mit diesen Abbaubanden interagiert, wurde die Präzipitation über Strep-Tactin Beads durchgeführt. Dabei wurde inaktives rekombinantes HTRA1ΔmacSA, welches an einen Strep-Tag fusioniert ist, mit der

Kinase-Domäne bei 37°C inkubiert, nachdem HTRA1 für eine Stunde an die Strep-Tactin Beads immobilisiert worden war. Von den einzelnen Schritten wurden Proben entnommen und mit Hilfe der SDS-Page und anschließender Coomassie-Blau Färbung konnte überprüft werden, ob die Kinase-Domäne an das immobilisierte HTRA1 gebunden hat. Um die gebundenen Proteine von den Beads zu lösen, wurden diese bei 95°C in SDS-Probenpuffer erhitzt.

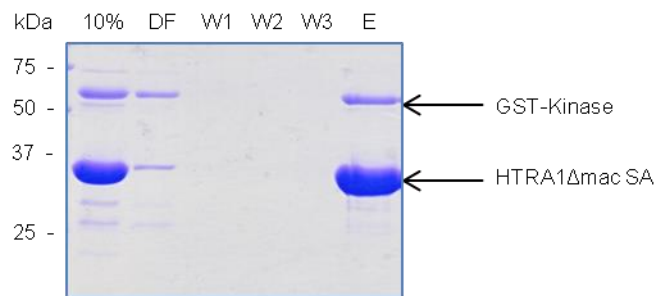


Abb. 4-24: *In vitro* Interaktion von immobilisiertem HTRA1ΔmacSA und der GST-BRAF-Kinase

Immobilisiertes Strep-fusioniertes HTRA1ΔmacSA wurde mit der GST-Kinase-Domäne bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Überstand entnommen (DF) und die Strep-Tactin Beads mehrmals mit Puffer gewaschen (W1-W3). Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte bei 95°C. Die Proben der einzelnen Schritte wurden zur Überprüfung auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die Reihenfolge der Proben (von links nach rechts): 10% der Gesamtprobe vor der Inkubation, Überstand nach der Immobilisation mittels Strep-Tactin Beads, Waschschrte 1-3, 50% der gesamten Elution.

Das SDS-Gel in Abb. 4-24 zeigt, dass auch immobilisiertes HTRA1ΔmacSA mit der Kinase-Domäne von BRAF interagiert. Im Überstand war fast kein HTRA1-Protein zu sehen, so dass die Immobilisation von HTRA1 an die die Strep-Tactin Beads erfolgreich war. In der Elution (rechts) befanden sich im Vergleich zu der Gesamtprobe (links) deutlich weniger Abbaubanden von der Kinase-Domäne. Das lässt vermuten, dass HTRA1ΔmacSA spezifisch an die Kinase-Domäne bindet und keine Interaktion mit den Abbaubanden eingeht.

Die C-terminale PDZ-Domäne von HTRA1 spielt eine wichtige Rolle für die Interaktionen zu den Ziel-Proteinen von HTRA1. Für HTRA1 konnte gezeigt werden, dass die PDZ-Domäne entbehrlich für die katalytische Aktivität ist und möglicherweise spielt sie für die Lokalisation von HTRA1 eine Rolle. Um zu überprüfen, ob die PDZ-Domäne für die Bindung zu den RAF-Proteinen essentiell ist, wurde der GST-Pulldown Assay mit rekombinantem HTRA1 ohne PDZ-Domäne durchgeführt. Auch hier handelt es sich um ein proteolytisch inaktives Protein (HTRA1ΔPDZ SA). HTRA1ΔPDZ SA wurde jeweils mit der RBD oder der Kinase-Domäne bei 37°C inkubiert. Die RAF-Proteine wurden zuvor für eine Stunde an

GST-Agarose Beads immobilisiert. Von den einzelnen Schritten wurden Proben entnommen und mit Hilfe der SDS-Page und anschließender Coomassie-Blau Färbung konnte überprüft werden, ob HTRA1 Δ PDZ SA an die immobilisierten RAF-Proteine gebunden hat. Um die gebundenen Proteine von den Beads zu lösen, wurden diese für die Elution bei 95°C in SDS-Probenpuffer erhitzt.

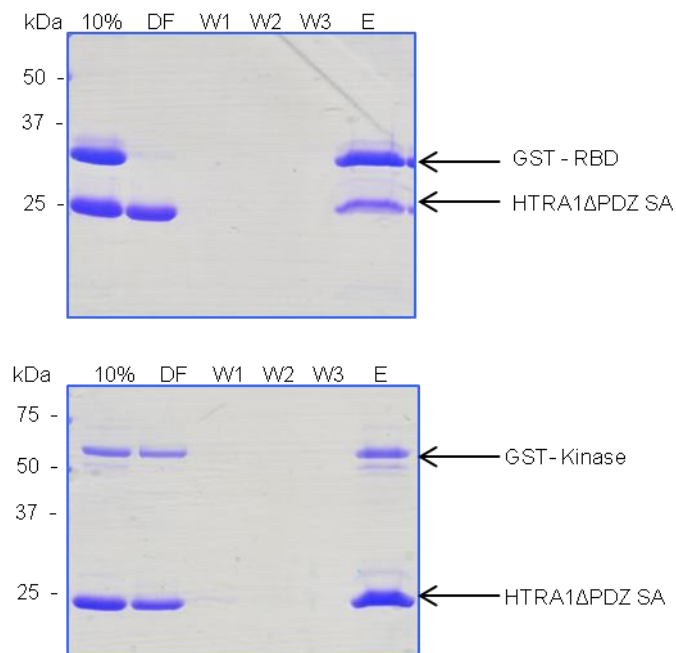


Abb. 4-25: *In vitro* Interaktion von HTRA1 Δ PDZ SA und immobilisierten RAF-Proteinen

HTRA1 Δ PDZ SA wurde jeweils mit der immobilisierten GST-RBD (oben) und der GST-Kinase-Domäne (unten) bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Überstand entnommen (DF) und die GST-Agarose Beads mehrmals mit Puffer gewaschen (W1-W3). Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte bei 95°C. Die Proben der einzelnen Schritte des GST-Pulldowns wurden zur Überprüfung auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die Reihenfolge der Proben (von links nach rechts): 10% der Gesamtprobe vor der Inkubation, Überstand nach der Immobilisation mittels GST-Agarose Beads, Waschschrte 1-3, 50% der gesamten Elution.

Die SDS-PAGE in Abb. 4-25 zeigt, dass auch HTRA1 Δ PDZ SA *in vitro* eine Bindung zu der RBD und der Kinase-Domäne von BRAF eingehen kann. Auch hier scheint die Interaktion durch die Menge der RAF-Proteine limitiert zu werden, da sich nach der Inkubation eine große Menge HTRA1 Δ PDZ SA im Überstand befand.

Um auszuschließen, dass HTRA1 unspezifisch mit dem GST-Tag der RAF-Proteine interagiert, wurde der GST-Pulldown Assay mit gereinigtem GST durchgeführt. Auch dieses Protein wurde vor dem Assay mittels GST-Agarose Beads immobilisiert und anschließend für eine Stunde mit HTRA1 Δ macSA bei 37°C inkubiert. Um die gebundenen Proteine von den

Beads zu lösen, wurden diese nach drei Waschschritten bei 95°C in SDS-Probenpuffer erhitzt.

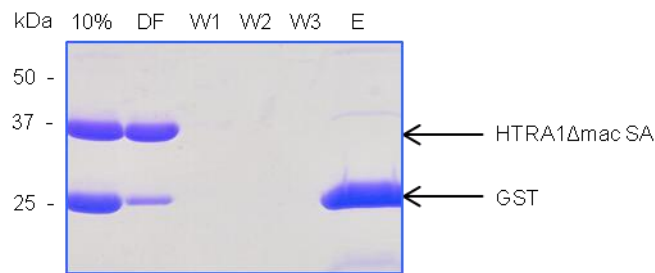


Abb. 4-26: *In vitro* Interaktion von HTRA1ΔmacSA und immobilisiertem GST

HTRA1ΔmacSA wurde mit GST bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Überstand entnommen (DF) und die GST-Agarose Beads mehrmals mit Puffer gewaschen (W1-W3). Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte bei 95°C. Die Proben der einzelnen Schritte des GST-Pulldowns wurden zur Überprüfung auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die Reihenfolge der Proben (von links nach rechts): 10% der Gesamtprobe vor der Inkubation, Überstand nach der Immobilisation mittels GST-Agarose Beads, Waschschriffe 1-3, 50% der gesamten Elution.

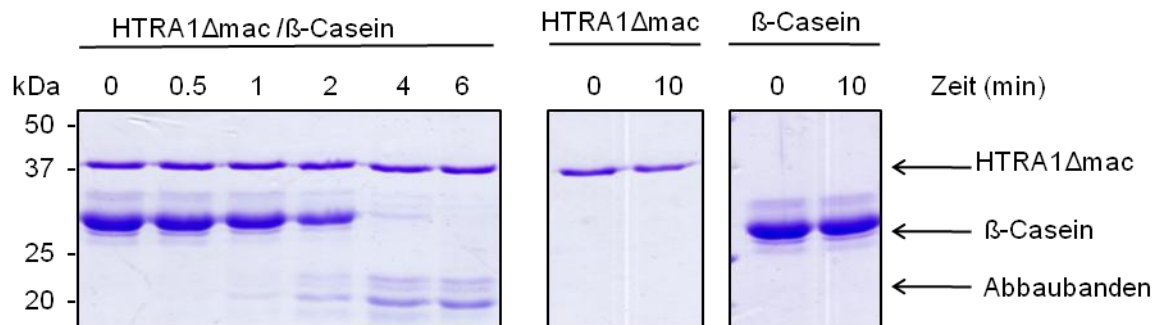
Die Abb. 4-26 zeigt den GST-Pulldown von HTRA1ΔmacSA und GST. Die Immobilisation von GST an die GST-Agarose Beads war auch hier erfolgreich, da nur geringe Mengen von GST im Überstand zu erkennen sind. In dem Elutionsschritt war kein HTRA1-Protein vorhanden, somit scheint HTRA1ΔmacSA nicht mit GST zu interagieren.

4.4.4 Synthetische RAF-Peptide haben keinen Einfluss auf die proteolytische Aktivität von HTRA1

Die GST-Pulldown Assays zeigen, dass HTRA1 eine Interaktion mit rekombinantem RAF eingeht. Es besteht die Möglichkeit, dass die Bindung zu den RAF-Proteinen die proteolytische Aktivität von HTRA1 beeinflusst. In einer Peptid-Bindestudie wurden die C-Termini von BRAF (Sequenz: QAGGYGAFPVH) sowie CRAF (Sequenz: TLTTSPRLPVF) als potentielle Interaktionspartner der HTRA1-PDZ-Domäne nachgewiesen. Um zu überprüfen, ob die Anwesenheit dieser Peptide die proteolytische Aktivität von HTRA1 beeinflusst, wurden die Peptide synthetisch hergestellt (AG Prof. Markus Kaiser, Universität Duisburg-Essen). Der Abbau von β -Casein, einem bekannten Substrat von HTRA1, wurde dann nach Zugabe dieser Peptide zeitlich verfolgt. Dafür wurden HTRA1 und β -Casein in einem molaren Verhältnis von 1:20 vermischt und bei 37°C inkubiert. Um den potentiellen Effekt der synthetischen Peptide zu verfolgen, wurden diese vor der Zugabe des Substrates mit HTRA1 für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Somit sollte eine Bindung der Peptide an HTRA1 gewährleistet werden. Um dann den proteolytischen Abbau von β -Casein zu verfolgen,

wurden nach mehreren Zeitpunkten Proben aus dem Reaktionsansatz entnommen, auf ein SDS-Gel aufgetragen und mittels Coomassie-Blau Färbung analysiert.

a)



b)

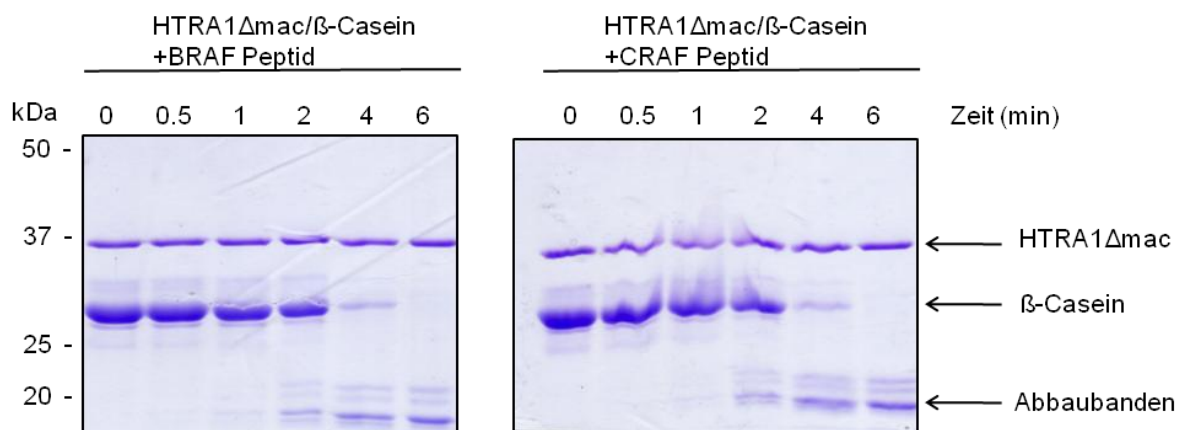


Abb. 4-27: Proteolytischer Abbau von β -Casein durch HTRA1 Δ mac nach Zugabe von RAF-Peptiden

- a) 1 μ M HTRA1 Δ mac und 20 μ M β -Casein wurden bei 37°C für 6 min inkubiert. Nach mehreren Zeitpunkten wurden Proben entnommen und auf ein SDS-Gel aufgetragen (links). Zur Kontrolle wurden beide Proteine getrennt voneinander für 10 min inkubiert (rechts), um eine Autoproteolyse bzw. Kontamination auszuschließen.
- b) 50 μ M BRAF- (links) bzw. 50 μ M CRAF-Peptid (rechts) wurden mit 1 μ M HTRA1 inkubiert, nach 15 min wurden 20 μ M β -Casein hinzugegeben und für weitere 6 min bei 37°C inkubiert. Nach mehreren Zeitpunkten wurden Proben entnommen und auf ein SDS-Gel aufgetragen, um den proteolytischen Abbau zu verfolgen.

Die SDS-Gele in Abb. 4-27 zeigen, dass β -Casein nach vier Minuten durch HTRA1 fast vollständig abgebaut wurde (a)). Die vorherige Inkubation mit den synthetisch hergestellten RAF-Peptiden übte allerdings keinen Effekt auf die proteolytische Aktivität von HTRA1 aus. Auch in diesen Reaktionsansätzen war nach vier Minuten ein Abbau von β -Casein zu erkennen (b)). Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die Interaktion mit den Peptiden keinen

regulatorischen Einfluss auf die Aktivität von HTRA1 hat. Jedoch wurde hier nicht überprüft, ob überhaupt eine Bindung der Peptide an HTRA1 stattgefunden hat.

4.5 Charakterisierung der HTRA1-RAF Interaktion in Melanomzellen

Mit den *in vitro* durchgeführten Experimenten konnte eine Interaktion zwischen HTRA1 und den jeweiligen rekombinanten RAF-Proteinen nachgewiesen werden. Als nächstes sollte überprüft werden, ob diese Interaktion auch innerhalb der Zelle mit endogenem und durch Überexpression produziertem HTRA1 zustande kommt. Um eine Interaktion zwischen HTRA1 und RAF in Zellkultur nachzuweisen, wurden GST-Pulldown Assays, Immunpräzipitationen und Immunfärbungen an den Melanom-Zelllinien durchgeführt. Gleichzeitig sollte überprüft werden, ob die konstitutiv aktiven Mutationen BRAF V600E oder NRAS Q61K einen Einfluss auf eine bestehende HTRA1-RAF Interaktion haben. Dafür wurden für die folgenden Experimente von jedem Genotyp die Einzelzellklone mit der höheren HTRA1-Expression verwendet.

4.5.1 HTRA1 interagiert mit der rekombinanten CRAF-RBD und der Kinase-Domäne von BRAF in Melanomzellen

Die rekombinanten GST-RAF-Proteine wurden im nächsten Schritt dazu verwendet eine Interaktion in löslichem Proteinextrakt der Melanom-Zelllinien zu untersuchen. Um den GST-Pulldown Assay in der Zellkultur zu etablieren, wurde zuerst überprüft, ob die rekombinante GST-RBD an endogene GTP-beladene RAS-Proteine bindet. Dazu wurden die Melanom-Zelllinien lysiert und 500 µg des proteinhaltigen Überstandes mit immobilisiertem GST-RBD für 90 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach drei anschließenden Waschschritten wurden die präzipitierten Proteine durch eine 10-minütige Inkubation bei 95°C eluiert. Um zu überprüfen, ob die aus *E. coli* produzierte und gereingte GST-RBD zytoplasmatische RAS-GTP Proteine binden kann, wurden die Eluate mittels SDS-PAGE und Immundetektion auf gebundenes RAS hin analysiert. Da die RBD nur an GTP-beladene RAS-Proteine bindet, kann die Menge an aktivem RAS nachgewiesen werden. Die folgende Abbildung zeigt die Immundetektion mittels einem pan-RAS Antikörper.

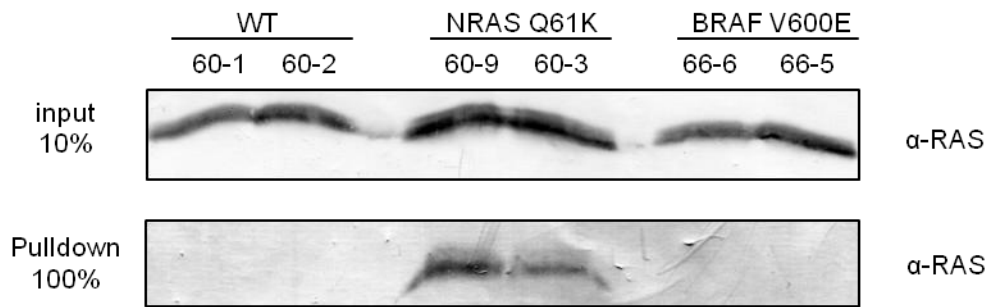


Abb. 4-28: GST-Pulldown Assay in Melanom-Zelllinien und Immundetektion von RAS

500 µg lösliches Proteinextrakt der sechs verschiedenen Melanom-Einzelzellklone wurden mit 50 µg GST-RBD inkubiert. Zuvor wurden 50 µg Proteinextrakt zur Input-Kontrolle abgenommen (oben). Nach der Inkubation bei 4°C wurden die an GST-RBD gebundenen Proteine mittels GST-Agarose Beads präzipitiert. Die Input-Kontrolle und die gesamte Elution wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen. Für die anschließende Immundetektion wurde ein pan-RAS Antikörper verwendet.

Das Ergebnis der Immundetektion in Abb. 4-28 zeigt die Gesamtmenge von RAS-Proteinen in den Einzelzellklonen der Melanom-Zelllinien. Diese unterscheidet sich nicht wesentlich, wenn man die beiden Zelllinien der jeweiligen Genotypen miteinander vergleicht (input, obere Reihe). Die Eluate des GST-Pulldowns zeigen eine Präzipitation von RAS in den NRAS Q61K Melanom-Zelllinien, dies lässt sich durch die konstitutiv aktive Mutation erklären. In den WT- und BRAF V600E-Zelllinien ließ sich hingegen kein aktives RAS-Protein nachweisen. Die basale Aktivierung von RAS ist bei fehlender Mutation sehr gering. Das Ergebnis lässt vermuten, dass die rekombinant hergestellten GST-Proteine die Fähigkeit besitzen an zelluläre Proteine zu binden und für Experimente mit zellulärem Material geeignet sind. In der folgenden Abbildung wird der Ablauf eines GST-Pulldown Experiments mit zellulärem Proteinextrakt schematisch dargestellt.

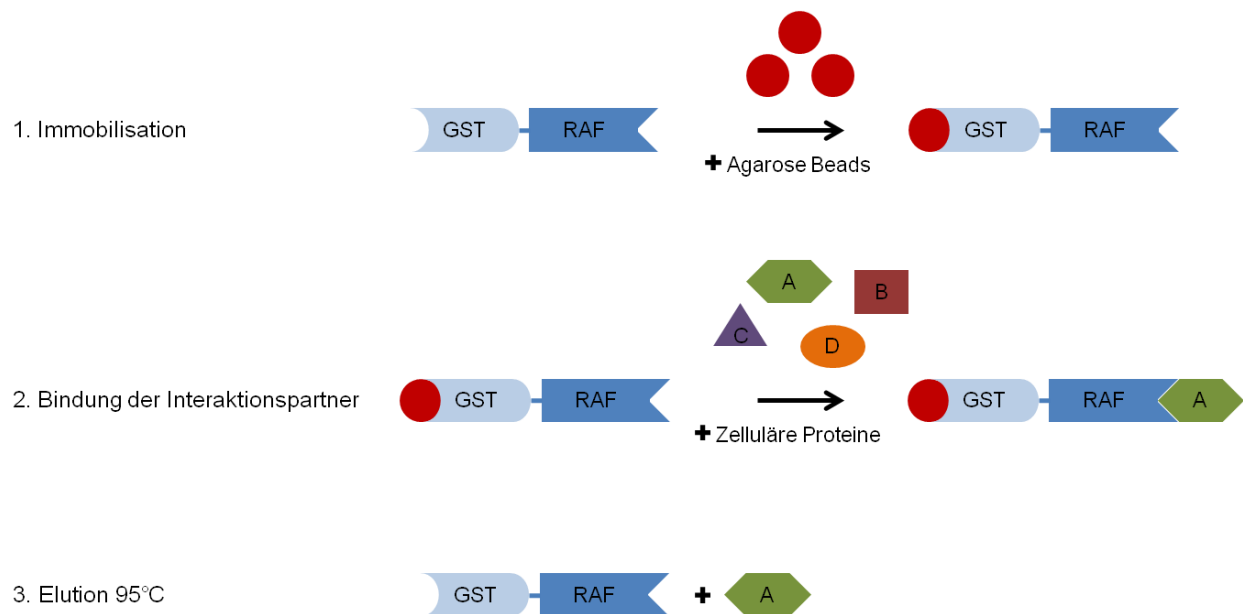


Abb. 4-29: Schematische Darstellung des GST-Pulldown Assays mit zellulärem Proteinextrakt

Der GST-Pulldown Assay beginnt mit der Immobilisation der RAF Fusionsproteine an GST-Agarose Beads (rote Kreise), es folgt die Zugabe und Inkubation mit zellulären Proteinen (Protein A, B, C, D) und die Elution der gebundenen Proteine bei 95°C.

Mit Hilfe des GST-Pulldown Assays sollte untersucht werden, ob zelluläres HTRA1 an die RBD oder Kinase-Domäne von RAF-Proteinen binden kann. Dafür wurde eine Melanom-Zelllinie jeden Genotyps mit einem HTRA1-Überexpressionsplasmid transfiziert. Dieses überproduzierte HTRA1 ist katalytisch aktiv, trägt die Signalsequenz zur extrazellulären Sekretion und hat einen C-terminalen myc-Tag, was die Detektion mit einem myc-Antikörper ermöglicht. Die transfizierten Zellen wurden für weitere 48 h kultiviert, um eine ausreichende Expression von HTRA1 zu gewährleisten. Danach wurden die Melanom-Zelllinien lysiert und 500 µg des proteinhaltigen Überstandes mit immobilisiertem GST-RBD oder GST-Kinase-Domäne für 90 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach drei anschließenden Waschschritten wurden die präzipitierten Proteine über eine 10-minütige Inkubation bei 95°C eluiert. Um zu überprüfen, ob die aus *E. coli* gereinigten GST-Proteine an HTRA1 binden, wurden die Eluate dann mittels SDS-PAGE und Immundetektion mit Hilfe eines myc-Antikörpers auf das Vorhandensein von HTRA1 untersucht.

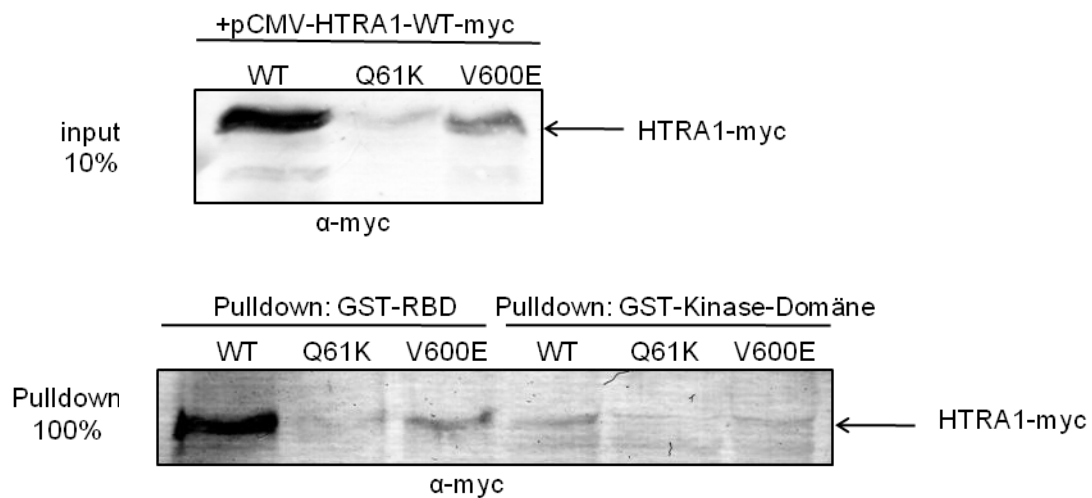


Abb. 4-30: GST-Pulldown Assay in Melanom-Zelllinien und Immundetektion von HTRA1

Die Melanomzellen (60-1/WT, 60-9/NRAS Q61K, 66-6/BRAF V600E) wurden mit einem HTRA1-myc Überexpressionsplasmid (pCMV-HTRA1-WT-myc) transfiziert und nach 48 h lysiert. Jeweils 500 µg lösliches Proteinextrakt wurden mit 50 µg GST-RBD bzw. 25 µg GST-Kinase-Domäne für 90 min bei 4°C inkubiert, zuvor wurden 50 µg Proteinextrakt zur Input-Kontrolle abgenommen (oben). Nach der Inkubation wurden die GST-Proteine mittels GST-Agarose Beads präzipitiert, der nichtgebundene Überstand entnommen und die gebundenen Proteine bei 95°C in SDS-Probenpuffer eluiert. Die Input-Kontrolle und die gesamte Elution wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen. Für die Immundetektion von überproduziertem, myc-fusioniertem HTRA1 wurde ein myc-Antikörper verwendet.

Das Ergebnis in Abb. 4-30 zeigt zum einen die Überproduktion von myc-fusioniertem HTRA1 (input 10%) in den Melanom-Zelllinien und zum anderen die Präzipitation von myc-fusioniertem HTRA1 mit Hilfe der RBD und der Kinase-Domäne von BRAF (Pulldown 100%). Wie bei den *in vitro* Experimenten (4.4.3) ließ sich hier eine Interaktion von zellulärem HTRA1 zu den RAF-Proteinen nachweisen. Die Menge an gebundenem HTRA1 korrelierte jeweils mit der Menge an Gesamt-HTRA1 (s. Input-Kontrolle). Mit Hilfe der RBD ließ sich eine höhere Menge an HTRA1 präzipitieren im Vergleich zur Kinase-Domäne. Dies könnte zum einen durch eine höhere Affinität von HTRA1 zur RBD erklärt werden oder auch durch die geringer eingesetzte Proteinmenge der Kinase-Domäne. Da die Überproduktion von HTRA1 in den drei Zelllinien unterschiedlich erfolgreich war und somit auch unterschiedliche HTRA1-Mengen im Proteinüberstand vorhanden waren, ist keine Aussage darüber zu treffen, ob die Stärke der Interaktion vom jeweiligen Genotyp abhängig ist. Möglicherweise sind die Unterschiede in den HTRA1-Mengen über die Effizienz der Plasmid-Transfektion zu erklären, da es sich hier auch um drei verschiedene Zelllinien handelt.

4.5.2 Koimmunpräzipitation von endogenem HTRA1 und RAF-Proteinen aus Melanomzellen

Mit Hilfe von Immunpräzipitationen (IP) sollte als nächstes die Interaktion von endogenem HTRA1 und endogenen RAF-Proteinen untersucht werden. Es wurde eine Interaktion zwischen der RBD und HTRA1 gezeigt (4.4.3 und 4.5.1) und da die RBD als Bindestelle für RAS definiert ist, sollte überprüft werden ob eine zusätzliche Bindung von RAS-Proteinen an HTRA1 vorhanden ist. Dafür wurden die Eluate der IP neben HTRA1 auch auf das Vorhandensein von BRAF und NRAS untersucht. Hierfür wurden zunächst Bedingungen für eine erfolgreiche Präzipitation von endogenem HTRA1 etabliert. Für die folgenden Immunpräzipitationen wurden die Einzelzellklone mit einer erhöhten HTRA1-Expression verwendet. Die Zellen wurden lysiert und 500 µg des proteinhaltigen Überstands mit einem HTRA1-Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Die daran gebundenen Proteine wurden dann mittels magnetischen Beads immobilisiert und nach mehreren Waschschritten bei 95°C in SDS-Probenpuffer eluiert. Die Eluate der IP wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und mit Hilfe der Immundetektion untersucht.

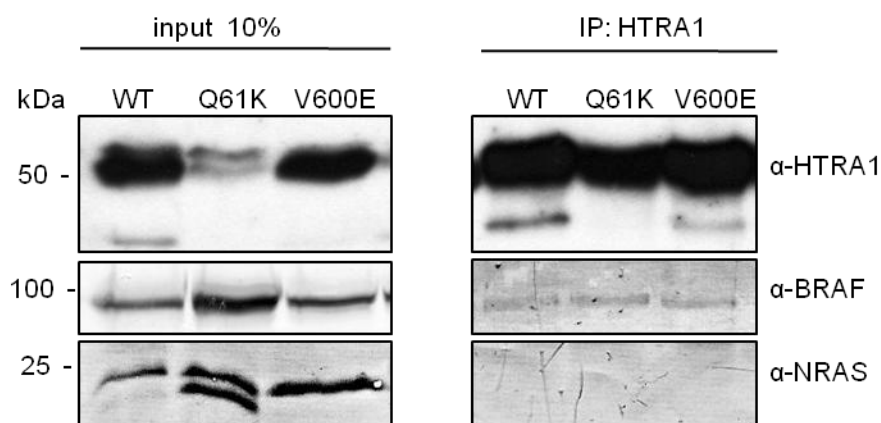


Abb. 4-31: Immunpräzipitation von HTRA1 aus Melanom-Zelllinien

Die Melanomzellen (60-1/WT, 60-9/NRAS Q61K, 66-6/BRAF V600E) wurden bis zu einer Zelldichte von etwa 80% kultiviert. Jeweils 500 µg lösliches Proteinextrakt wurden über Nacht mit α-HTRA1 bei 4°C inkubiert, zuvor wurden 50 µg Proteinextrakt zur Input-Kontrolle abgenommen (links). Nach der Inkubation wurden der Antikörper und die gebundenen Proteine mittels magnetischen Beads präzipitiert, der nichtgebundene Überstand entnommen und die gebundenen Proteine bei 95°C in SDS-Probenpuffer nach mehreren Waschschritten eluiert. Die Input-Kontrolle und die gesamte Elution der IP (rechts) wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und mittels α-HTRA1, α-BRAF und α-NRAS analysiert.

Die Abb. 4-31 zeigt eine erfolgreiche IP von HTRA1 aus den drei Melanom-Einzelzellklonen (obere Reihe). Mit der Präzipitation von HTRA1 ließ sich ebenfalls BRAF im Eluat nachweisen (mittlere Reihe), wohingegen kein NRAS detektiert wurde (untere Reihe). Dieses

Ergebnis spricht dafür, dass HTRA1 und BRAF unabhängig vom Genotyp der Zelllinien eine Interaktion eingehen und NRAS nicht daran beteiligt ist.

Um die Interaktion zwischen HTRA1 und BRAF zu bestätigen wurde endogenes BRAF präzipitiert. Die Zellen wurden lysiert und 500 µg des proteinhaltigen Überstands mit einem BRAF-Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Die daran gebundenen Proteine wurden dann mit Hilfe von magnetischen Beads immobilisiert und nach mehreren Waschschritten bei 95°C in SDS-Probenpuffer eluiert. Die Eluate der IP wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und mit Hilfe der Immundetektion untersucht.

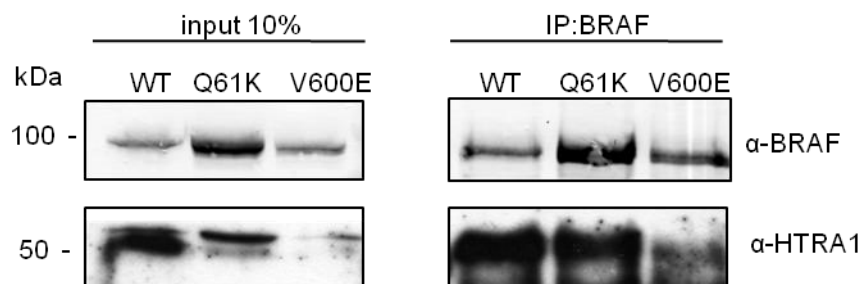


Abb. 4-32: Immunpräzipitation von BRAF aus Melanom-Zelllinien

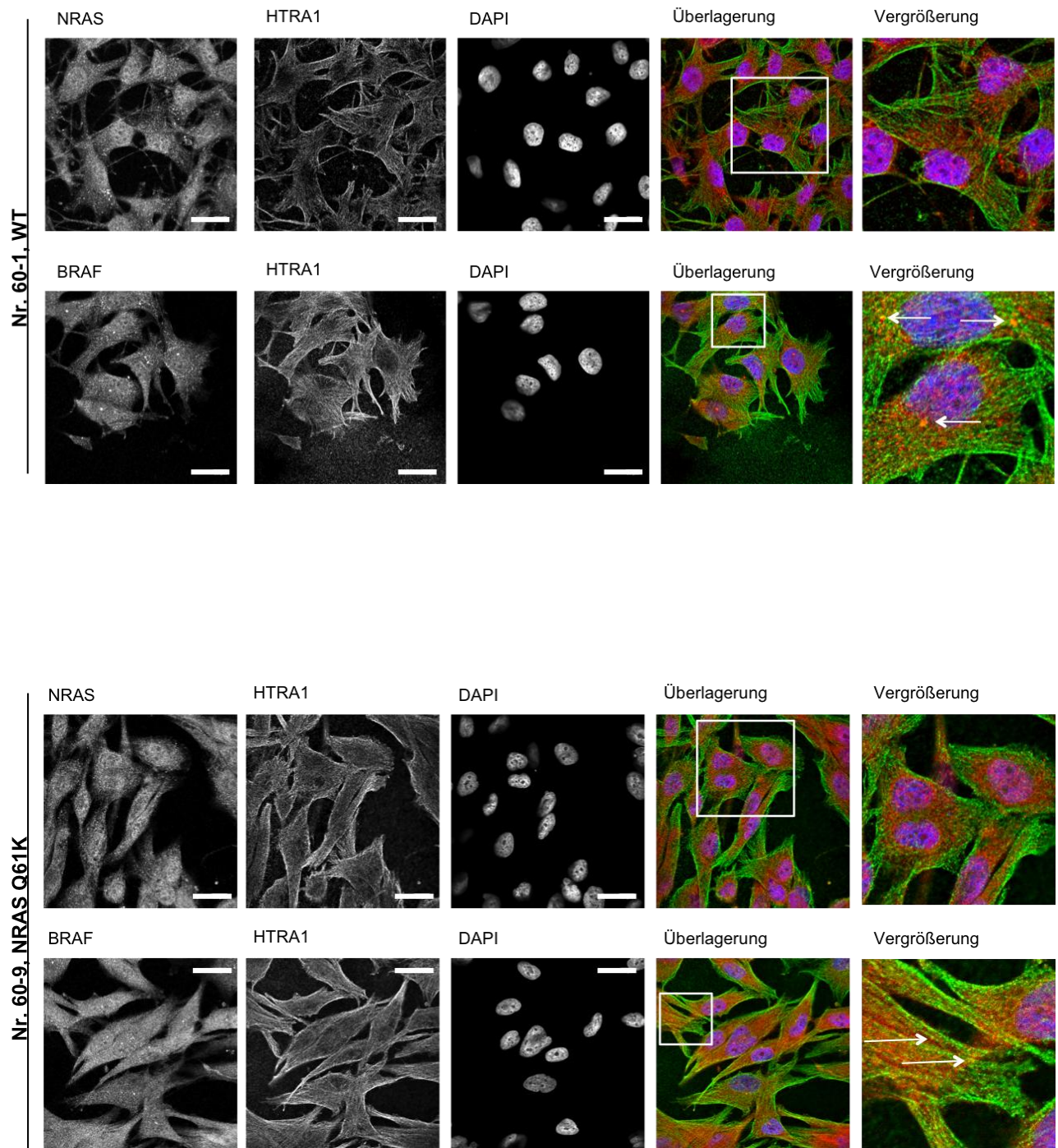
Die Melanomzellen (60-1/WT, 60-9/NRAS Q61K, 66-6/BRAF V600E) wurden bis zu einer Zelldichte von etwa 80% kultiviert. Jeweils 500 µg lösliches Proteinextrakt wurden über Nacht mit α-BRAF bei 4°C inkubiert, zuvor wurden 50 µg Proteinextrakt zur Input-Kontrolle abgenommen (links). Nach der Inkubation wurden der Antikörper und die gebundenen Proteine mittels magnetischen Beads präzipitiert, der nichtgebundene Überstand entnommen und die gebundenen Proteine bei 95°C in SDS-Probenpuffer nach mehreren Waschschritten eluiert. Die Input-Kontrolle und die gesamte Elution der IP (rechts) wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und mittels α-HTRA1 und α-BRAF analysiert.

Die Abb. 4-32 zeigt, dass sich endogenes BRAF erfolgreich aus den Melanom-Zelllinien präzipitieren ließ und auch hier war eine Koimmunpräzipitation von BRAF und HTRA1 zu erkennen. Damit wird eine endogene Interaktion zwischen HTRA1 und BRAF in Melanomzellen bestätigt, die unabhängig vom Genotyp der Zelllinien ist.

4.5.3 Immunfluoreszenz-Färbungen zeigen eine Kolokalisation von HTRA1 und BRAF in Melanomzellen

Vorherige Immunfluoreszenz-Färbungen haben eine Genotyp-abhängige Lokalisation von HTRA1 gezeigt (Abb. 4-18). Nun sollte mit Hilfe der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie HTRA1 und BRAF innerhalb der Zelle nachgewiesen werden und untersucht werden, ob die intrazelluläre Lokalisation von HTRA1 einen Einfluss auf eine Kolokalisation dieser beiden Proteine hat. Dafür wurden die Melanom-Einzelzellklone mit einer erhöhten Menge an HTRA1-Protein (Abb. 4-16) auf Objektträgern ausgesät. Nach dem Anwachsen der Zellen

wurde diese fixiert, mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert und mikroskopisch untersucht.



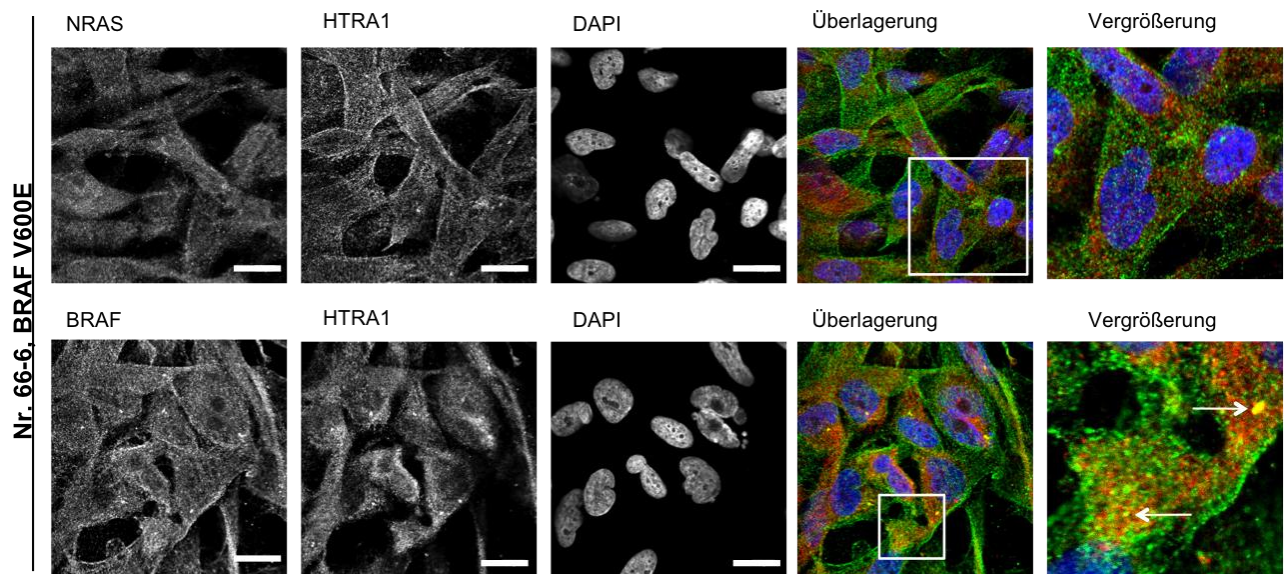


Abb. 4-33: Lokalisation von NRAS, BRAF und HTRA1 in Melanom-Zelllinien

Die Melanom-Einzelzellklone (60-1/WT, 60-9/NRAS Q61K, 66-6/BRAF V600E) wurden fixiert und gefärbt. Der Zellkern wurde mit DAPI gefärbt (blau), HTRA1 mit einem HTRA1-Antikörper und einem Alexa-488 gekoppelten Sekundärantikörper (grün) und NRAS bzw. BRAF mit einem NRAS- bzw. BRAF-Antikörper und einem Alexa-633 gekoppelten Sekundärantikörper (rot). Die Untersuchung der Zellen erfolgte mittels konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie. Die Vergrößerung zeigt den weiß umrandeten Bereich in der Überlagerung. Die Pfeile deuten auf Kolokalisationen hin. Maßstab: 20 μ m.

Die mikroskopische Untersuchung der Zellen ergab, dass eine Kolokalisation von HTRA1 und BRAF vorliegt (s. Pfeile in Abb. 4-33). Während die Färbung von HTRA1 und NRAS keine Kolokalisation der beiden Proteine zeigte. Dieses Ergebnis bestätigt die Ergebnisse der vorherigen Immunpräzipitationen. Die Kolokalisation ist teilweise intrazellulär (66-6), an der Zellmembran (60-9) und auch in der Nähe des Zellkerns (60-1 und 66-6) zu beobachten.

4.6 Funktionelle Effekte von HTRA1 auf den ERK-Signalweg

Aufgrund der beobachteten Interaktion zwischen HTRA1 und BRAF stellt sich die Frage, welche Funktion HTRA1 im zellulären Zusammenspiel hat und welchen Einfluss die HTRA1-Expression auf die ERK-Signalkaskade ausübt. Mögliche Effekte könnten über einen Proteinabbau, eine verstärkte Protein-Protein-Interaktion oder auch über eine Änderung der Phosphorylierung von MEK und ERK zustande kommen. Diese möglichen Mechanismen sollen im Folgenden untersucht werden.

4.6.1 Die CRAF-RBD wird *in vitro* von HTRA1 abgebaut

Um zu überprüfen, ob die RBD neben einem Bindepartner ein Protease-Substrat für HTRA1 darstellt, wurde proteolytisch aktives HTRA1 Δ mac mit der RBD inkubiert. Das rekombinante HTRA1 Δ mac wurde mit der RBD (ohne GST-Tag) in einem molaren Verhältnis von 1:20 (Protease:Substrat) gemischt und bei 37°C für 4 h inkubiert. Um einen proteolytischen Abbau der RBD zu verfolgen, wurden nach mehreren Zeitpunkten Proben aus dem Reaktionsansatz entnommen, auf ein SDS-Gel aufgetragen und mittels Coomassie-Blau Färbung analysiert.

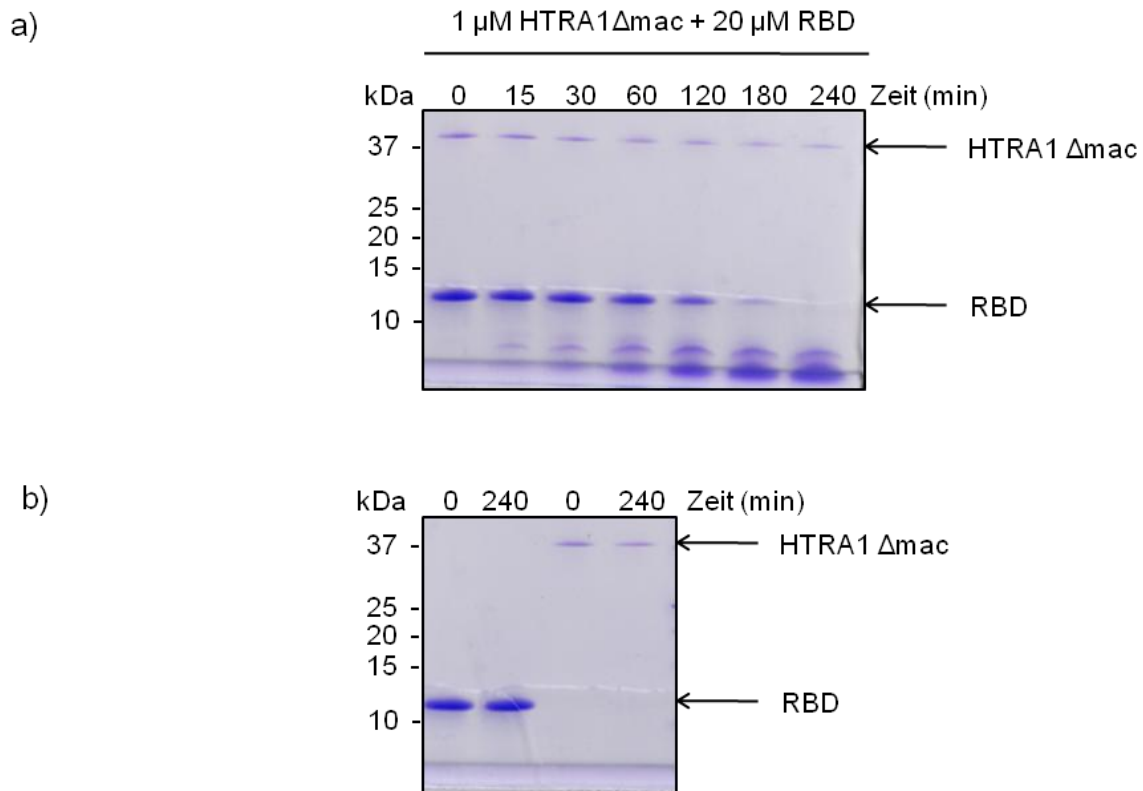


Abb. 4-34: Proteolytischer Verdau der RBD durch HTRA1 Δ mac

- a) 1 μ M HTRA1 Δ mac und 20 μ M RBD wurden für 240 Minuten bei 37°C in 50 mM Tris, pH 8.0 inkubiert. Die Proben wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten aus der Reaktion entnommen, bei 95°C in SDS-Probenpuffer aufgekocht und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Daten und Abbildung von J. Rey.
- b) 1 μ M HTRA1 Δ mac bzw. 20 μ M RBD wurden für 240 Minuten bei 37°C in 50 mM Tris, pH 8.0 inkubiert. Am Start- und Endzeitpunkt wurden Proben aus der Reaktion entnommen, bei 95°C in SDS-Probenpuffer aufgekocht und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Daten und Abbildung von J. Rey.

Der *in vitro* HTRA1-Verdau in Abb. 4-34 a) zeigt, dass die RBD nach vier Stunden vollständig durch HTRA1 abgebaut wurde. Bereits nach 15 Minuten waren erste Abbaubanden zu erkennen, die mit der Zeit kontinuierlich zunahm. Die rekombinanten Proteine zeigten keine Verringerung der Proteinmenge oder Abbaubanden bei getrennter Inkubation (b)). Die

RAS-Bindedomäne von CRAF stellt somit ein potentielles Substrat für HTRA1 dar, sodass der Abbau von RAF-Proteinen durch HTRA1 im Zytoplasma als möglicher Regulationsmechanismus eine Rolle spielen könnte.

4.6.2 Eine Aktivierung der ERK-Signalkaskade verstärkt die Interaktion zwischen HTRA1 und BRAF

Um die Interaktion zwischen HTRA1 und BRAF näher zu charakterisieren und Hinweise auf einen Regulationsmechanismus zu bekommen, wurde der ERK-Signalweg über die Behandlung mit humanem IGF aktiviert. Es wurde dann mittels IP überprüft, ob sich die Aktivierung der Kinase-Kaskade auf die Bindungsaffinität zwischen HTRA1 und BRAF auswirkt. Hierfür wurde der WT-Melanom-Einzelzellklon mit erhöhter HTRA1-Expression (Nr. 60.-1) verwendet. Die Zellen wurden 30 Minuten nach einer Behandlung mit IGF lysiert und 500 µg des proteinhaltigen Überstands mit einem BRAF-Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Die daran gebundenen Proteine wurden dann mit Hilfe von magnetischen Beads immobilisiert und nach mehreren Waschschritten bei 95°C in SDS-Probenpuffer eluiert. Die Eluate der IP wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und mit Hilfe der Immundetektion untersucht.

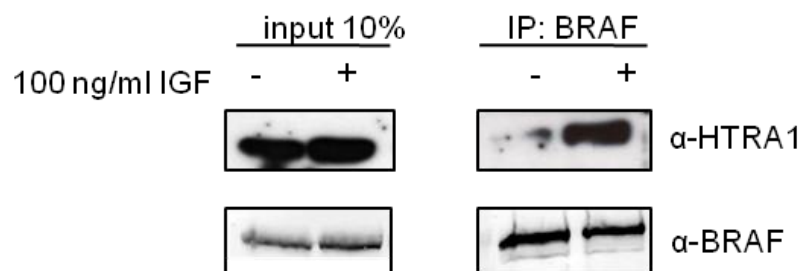


Abb. 4-35: Immunpräzipitation von BRAF aus WT-Melanomzellen nach IGF-Behandlung

Die WT-Melanomzellen (Nr. 60-1) wurden 24 h nach dem Anwachsen mit 100 ng/ml IGF behandelt. Nach 30 min wurden die Zellen lysiert und 500 µg lösliches Proteinextrakt mit α-BRAF über Nacht bei 4°C inkubiert, zuvor wurden 50 µg Proteinextrakt zur Input-Kontrolle abgenommen. Nach der Inkubation wurden der Antikörper und die gebundenen Proteine mittels magnetischen Beads präzipitiert, der nichtgebundene Überstand entnommen und die gebundenen Proteine bei 95°C in SDS-Probenpuffer nach mehreren Waschschritten eluiert. Die Input-Kontrolle (links) und die gesamte Elution der IP (rechts) wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und mittels α-HTRA1 und α-BRAF analysiert.

Die Abb. 4-35 zeigt eine erhöhte Koimmunpräzipitation von HTRA1, nachdem die Zellen mit dem Wachstumsfaktor IGF behandelt wurden. Die Proteinmengen von HTRA1 und BRAF vor und nach der IGF-Zugabe weichen nicht stark voneinander ab, so dass die erhöhte HTRA1-Menge im Eluat für eine gesteigerte Interaktion mit BRAF spricht, nachdem der Signalweg über IGF aktiviert wurde. Die Stimulation der Signalkaskade wurde über eine Immundetektion von phosphoryliertem MEK überprüft. Hierbei war eine deutliche

Anreicherung von aktiviertem MEK zu beobachten, wohingegen die Gesamtmenge an MEK unverändert blieb (nicht abgebildet).

Zur weiteren Untersuchung der HTRA1-BRAF Interaktion wurde den Melanomzellen das Serum aus dem Kulturmedium entzogen, um so eine verringerte Aktivität der Signalkaskade zu erhalten. Nach 24 Stunden wurden auch hier der humane Wachstumsfaktor IGF hinzugegeben, um eine Reaktivierung der Signalkaskade zu erreichen. Die Zellen wurden jeweils vor und nach der IGF-Behandlung lysiert und 500 µg des proteinhaltigen Überstands mit einem BRAF-Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Die daran gebundenen Proteine wurden dann mit Hilfe von magnetischen Beads immobilisiert und nach mehreren Waschschritten bei 95°C in SDS-Probenpuffer eluiert. Die Eluate der IP wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und mit Hilfe der Immundetektion untersucht.

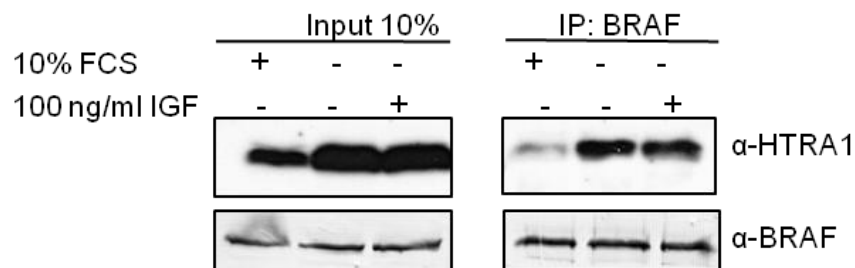


Abb. 4-36: Immunpräzipitation von BRAF aus WT-Melanomzellen nach Serumentzug und IGF-Behandlung

Den WT-Melanomzellen (Nr. 60-1) wurde nach dem Anwachsen über einen Zeitraum von 24 h das Serum entzogen, darauf folgte eine Behandlung mit 100 ng/ml IGF. Nach 30 min wurden die Zellen lysiert und 500 µg lösliches Proteinextrakt mit α-BRAF über Nacht bei 4°C inkubiert, zuvor wurden 50 µg Proteinextrakt zur Input-Kontrolle abgenommen. Nach der Inkubation wurden der Antikörper und die gebundenen Proteine mittels magnetischen Beads präzipitiert, der nichtgebundene Überstand entnommen und die gebundenen Proteine bei 95°C in SDS-Probenpuffer nach mehreren Waschschritten eluiert. Die Input-Kontrolle (links) und die gesamte Elution der IP (rechts) wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und mittels α-HTRA1 und α-BRAF analysiert.

Die Immundetektion in Abb. 4-36 zeigt, dass die Zellen auf den Serumentzug mit einer erhöhten HTRA1-Expression reagiert haben, welche auch nach der 30-minütigen IGF-Behandlung noch zu erkennen war. Die gesteigerte HTRA1-Expression könnte eine zelluläre Antwort auf die zugeführte Stresssituation darstellen. Die Erhöhung von HTRA1 in der *Input*-Probe korreliert stark mit der erhöhten Menge an koimmunpräzipitiertem HTRA1, sodass dieses Ergebnis keine Aktivitätsabhängige Interaktion zwischen HTRA1 und BRAF zeigt.

4.6.3 Unterschiede in der HTRA1-Expression haben keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von MEK und ERK

Proteolytisch aktives HTRA1 beeinflusst die Phosphorylierung der MAPK P38 (Supanji et al., 2013). Daher sollte als nächstes der Einfluss einer erhöhten HTRA1-Expression auf die Phosphorylierung der beiden Kinasen MEK und ERK untersucht werden. Die Kinase MEK wird von zuvor aktiviertem BRAF über Phosphorylierung in den aktiven Zustand gebracht, MEK wiederum aktiviert die Kinase ERK über Phosphorylierung. Ein möglicher Effekt von HTRA1 kann so über die Menge an phosphorylierten MEK- und ERK-Proteinen analysiert werden. Hierfür wurden die sechs Melanom-Einzelzellklone kultiviert, die Zellen lysiert und der proteinhaltige Überstand mit Hilfe von SDS-PAGE und Immundetektion untersucht.

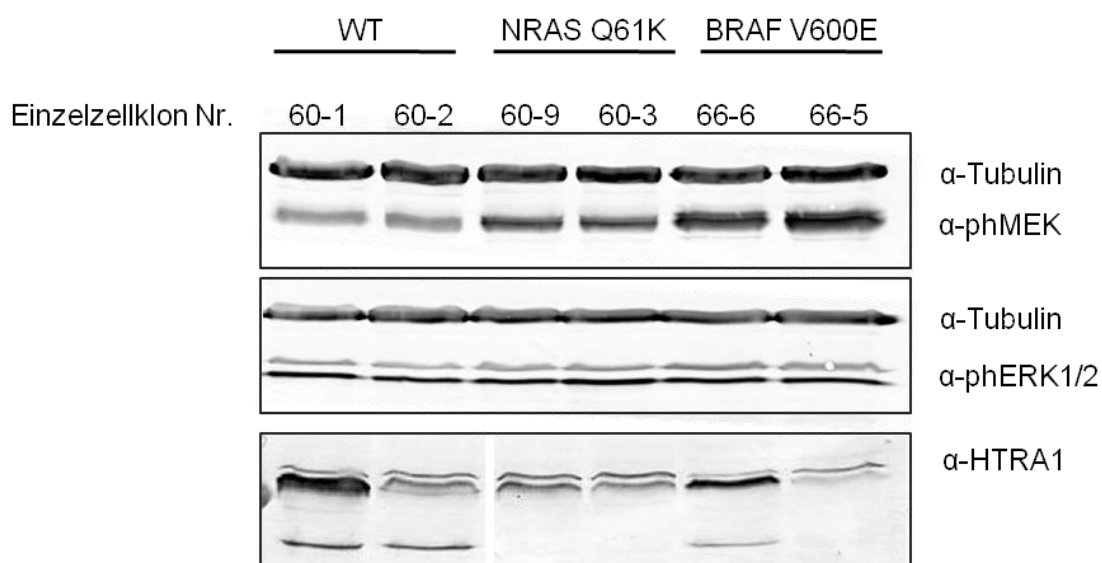


Abb. 4-37: Immundetektion von phospho-MEK, phospho-ERK und HTRA1 in Melanomzellen

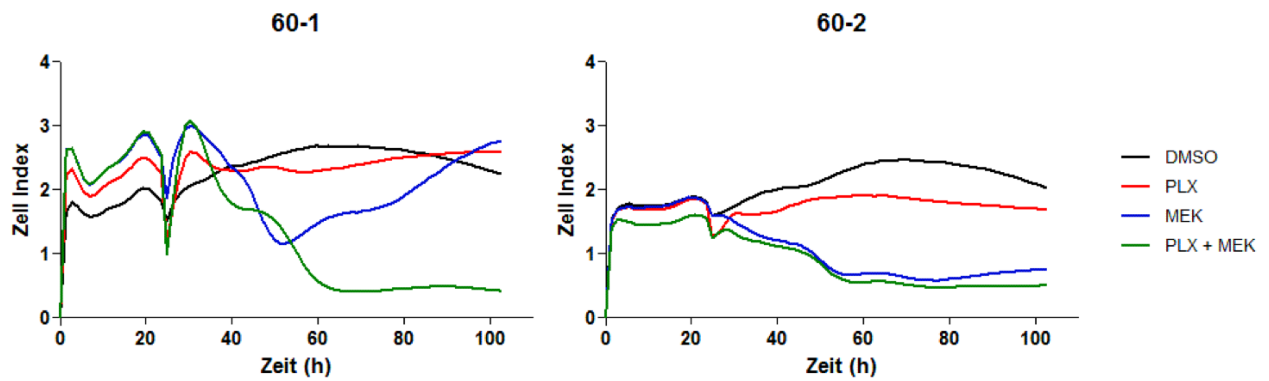
Jeweils 50 µg (phospho MEK und ERK) bzw. 100 µg (HTRA1) lösliches Proteinextrakt wurden mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine mit entsprechenden Antikörpern sichtbar gemacht. Als Proteinladekontrolle für die Detektion der Phosphorylierungen dient Tubulin.

Die Immundetektion zeigt, dass die Phosphorylierung von MEK in den WT-Zellen am geringsten und in den BRAF V600E-Zellen am stärksten war. Die ERK-Kinase zeigte eine unveränderte Phosphorylierung in den unterschiedlichen Genotypen. Die Abb. 4-37 zeigt außerdem keine HTRA1-abhängige Veränderung der Phosphorylierungen von MEK und ERK. Dies spricht dafür, dass die unterschiedlichen HTRA1-Expressionen keinen Einfluss auf die Effektoren der Signalkaskade ausüben. HTRA1 ist wie erwartet in den Einzelzellklonen Nr. 60-1, 60-9 und 66-6 stärker exprimiert als im jeweiligen Vergleich zu den Einzelzellklonen 60-2, 60-3 und 66-5 (untere Reihe).

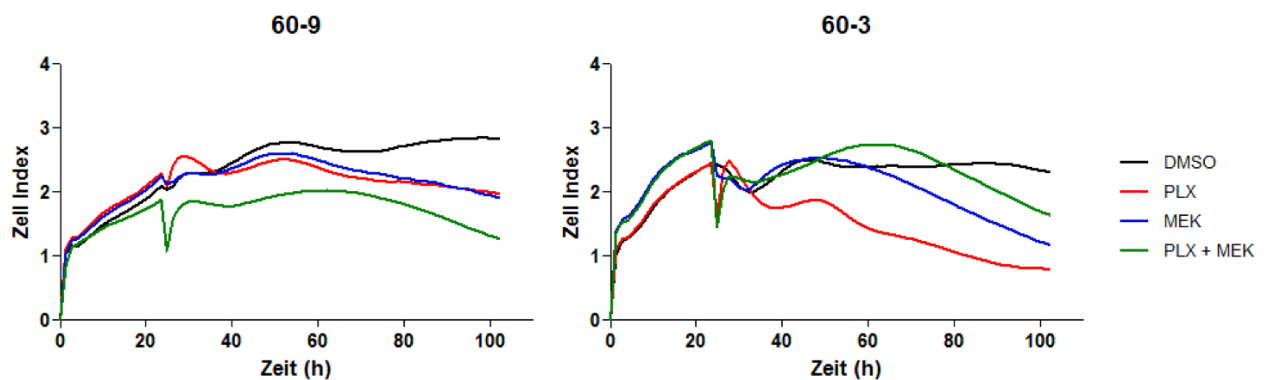
4.6.4 Proliferationsverhalten der Melanomzellen nach Hemmung der ERK-Signalkaskade

Das Zellwachstum ist in Tumorzellen stark erhöht und die konstitutiv aktiven Mutationen des BRAF- bzw. NRAS-Proteins begünstigen zusätzlich die Proliferation in den Melanomzellen. Eine Überexpression von HTRA1 hingegen hemmt die Proliferation in primären aus Metastasen gewonnenen Melanom-Zelllinien (Baldi et al., 2002). Eine Therapiemöglichkeit des Melanoms besteht über die Substitution von Inhibitoren, welche den ERK-Signalweg hemmen. Dazu gehören u.a. BRAF V600E- und MEK-Inhibitoren. Im Folgenden sollte die Zellproliferation nach der Zugabe von diesen Inhibitoren im Zusammenhang mit der HTRA1-Expression und den unterschiedlichen Genotypen der Melanomzellen untersucht werden. Bei den Inhibitoren handelte es sich um den molekularen BRAF V600E Hemmer PLX4032 und den MEK-Inhibitor GSK1120212. Für die Analyse wurden die Melanom-Einzelzellklone nach der Adhärations (24 h) einzeln und in Kombination mit den jeweiligen Inhibitoren behandelt. Die Zellproliferation wurde nach der Behandlung für weitere 78 h beobachtet und aufgezeichnet. Hierfür wurde das *xCELLigence* System verwendet, welches ein kontinuierliches *online-Monitoring* von adhären Zellen ermöglicht (Die Proliferationsexperimente wurden durchgeführt von A. Sucker, Hautklinik, Universitätsklinikum Essen). Die Zellproliferation wurde über die elektrische Impedanz gemessen und der Wert als dimensionsloser Zell Index (CI) wiedergegeben. Unter gleichbleibenden Bedingungen steigt bzw. sinkt der CI bei einem erhöhten bzw. verringerten Zellwachstum.

a) WT Melanom-Einzelzellklone



b) NRAS Q61K Melanom-Einzelzellklone



c) BRAF V600E Melanom-Einzelzellklone

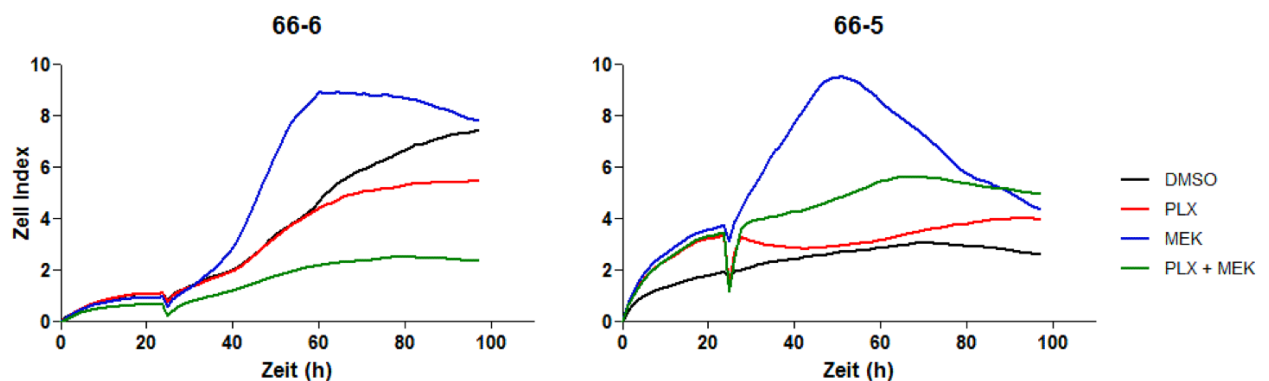


Abb. 4-38: Zellproliferation der Melanom-Einzelzellklone nach Zugabe von PLX4032 und/oder des MEK-Inhibitors GSK1120212

Die Melanom-Einzelzellklone wurden ausgesät und für 24 h kultiviert. Dann erfolgte die Zugabe von DMSO, 10 μ M PLX4032 (PLX), 1 μ M GSK1120212 (MEK) oder eine Kombination beider Inhibitoren. Die Zellproliferation wurde für weitere 78 h verfolgt und die Veränderungen im Zellwachstum als Zell Index auf der Y-Achse wiedergegeben. In a), b) und c) sind die beiden Einzelzellklone der jeweiligen Genotypen (WT, NRAS Q61K, BRAF V600E) abgebildet. Jedes Experiment wurde in einer Doppelbestimmung durchgeführt und mindestens dreimal wiederholt.

Die Graphen in Abb. 4-38 zeigen große Unterschiede im Proliferationsverhalten der Melanom-Einzelzellklone. Lediglich nach der Zugabe der Substanzen (bei 24 h) war bei allen Experimenten ein Einbruch im Proliferationsverhalten zu erkennen. Die WT-Melanomzellen wurden durch die Zugabe von PLX4032 nicht wesentlich in ihrem Wachstum gehemmt, wohingegen die Hemmung der MEK-Kinase zu einem Einbruch im Zellwachstum führte (a)). Der Einzelzellklon mit erhöhter HTRA1-Expression (Nr. 60-1) zeigte hier etwa 24 h nach der Behandlung ein erneutes Zunehmen der Zellzahl. Das Wachstum der NRAS-mutierten Melanomzellen nahm durch die Zugabe von PLX4032, des MEK-Inhibitors und beider Inhibitoren in Kombination stetig über den gemessenen Zeitraum im Vergleich zur DMSO-Kontrolle ab (b)), sodass davon auszugehen ist, dass beide Inhibitoren den ERK-Signalweg hemmen. Die Melanomzellen mit einer BRAF-Mutation zeigten eine deutliche Zunahme der Zellproliferation nach der Zugabe des MEK-Inhibitors. Nach 24 h war jedoch hier eine Abnahme der Zellproliferation zu beobachten. Die Behandlung mit dem spezifischen BRAF V600E Inhibitor PLX4032 führte zu keiner signifikanten Änderung im Zellwachstum im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (c)). Dies könnte durch das Fehlen von PTEN auf Proteinebene in diesen Zellklonen zu erklären sein. Der Verlust von PTEN führt zu einer erhöhten Aktivierung des PI3K/AKT Signalweges nach der spezifischen Hemmung von BRAF V600E (Paraiso et al., 2011), sodass die Zellproliferation hier evtl. über einen alternativen Signalweg reguliert wird.

Im Hinblick auf den Genotyp sind deutliche Unterschiede im Proliferationsverhalten der Melanom-Einzelzellklone zu erkennen. Desweiteren sollte die Proliferation der Melanom-Einzelzellklone im Zusammenhang mit den unterschiedlichen HTRA1-Expression analysiert werden. Dafür wurden die Steigungen der jeweiligen Wachstumskurven nach der Zugabe der Substanzen bis zum Ende der Messung (beim Zeitpunkt 102 h) ermittelt.

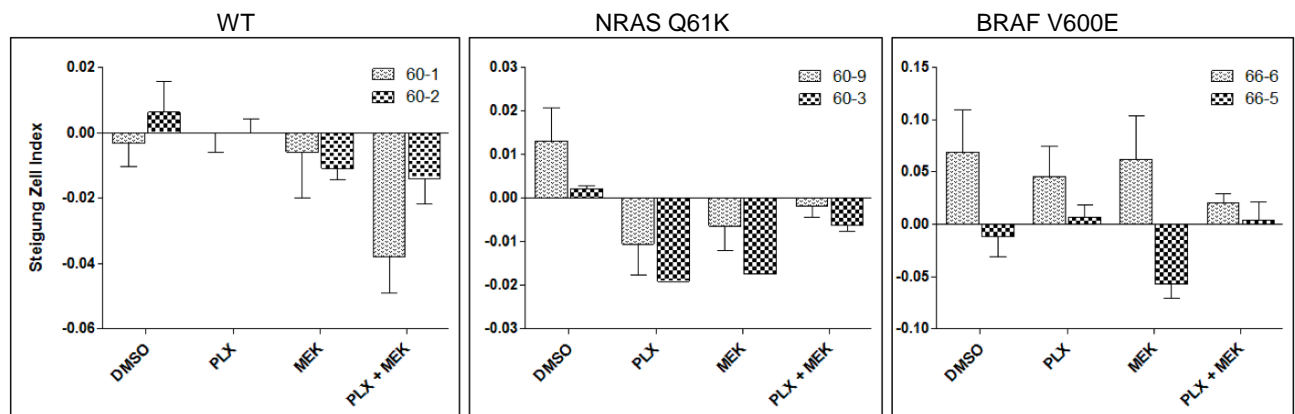


Abb. 4-39: Steigung der Zellproliferation der Melanom-Einzelzellklone nach Zugabe von PLX4032 und/oder des MEK-Inhibitors GSK1120212

Ausgehend von den Wachstumskurven in Abb. 4-38 wurde die Steigung des Zellwachstums über 72 h ermittelt (von 30 – 102 h) und der Mittelwert mit zugehöriger Standardabweichung von mindestens zwei Versuchsdurchführungen errechnet. In einem Diagramm sind die Einzelzellklone mit erhöhter (helle Balken) und dazu vergleichsweise erniedrigter (dunkle Balken) HTRA1-Expression dargestellt. Von links nach rechts sind die WT-, NRAS Q61K- und BRAF V600E-Melanomzellen abgebildet.

Die Steigungen der Wachstumskurven in Abb. 4-39 zeigen in den DMSO-behandelten Kontrollen der NRAS- und BRAF-mutierten Zellklone eine erhöhte Proliferation, in welchen ebenfalls die HTRA1-Expression erhöht ist. Bei den DMSO-behandelten WT-Zellklonen war ein entgegengesetztes Wachstum zu beobachten. Nach der kombinierten Inhibitor-Behandlung (PLX + MEK) waren hier die höher HTRA1-exprimierenden Zellen (Nr. 60-1) deutlich stärker in ihrem Wachstum gehemmt als die geringer HTRA1-exprimierenden Zellen (60-2). In den NRAS Q61K-Melanomzellen war vergleichsweise zur anfänglichen Proliferation in der DMSO-behandelten Kontrolle kein deutlicher Unterschied im Zusammenhang mit der HTRA1-Expression zu erkennen, da die absoluten Werte der Steigungs-Differenzen relativ ähnlich waren. Bei den BRAF-mutierten Melanomzellen war lediglich in dem erniedrigten HTRA1-exprimierendem Zellklon (Nr. 66-5) ein verringertes Zellwachstum nach der Zugabe des MEK-Inhibitors zu beobachten. Die kombinierte Behandlung mit PLX4032 hatte dieses wieder aufgehoben.

5 Diskussion

Die HTRA-Proteasen sind an zellulären Prozessen beteiligt, hierzu zählen die mitochondriale Homöostase, die Apoptose und zelluläre Signalwege. Außerdem sind sie mit der Entwicklung von Tumorerkrankungen, arthritischen Entzündungen und neurodegenerativen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht worden (Baldi et al., 2008; Grau et al., 2005; Hu et al., 1998). In der Tumorgenese spielt insbesondere die fehlregulierte Genexpression von *HTRA1*, *HTRA2* und *HTRA3* eine Rolle. Die Herunterregulation der drei Gene ist in vielen Tumorarten beschrieben (Narkiewicz et al., 2009b), wobei für *HTRA2* auch eine Überexpression im Prostatakarzinom gezeigt worden ist (Hu et al., 2006). Der HTRA1-Protease werden tumorsuppressive Eigenschaften zugesprochen und sie stellt daher ein interessantes Ziel für die Behandlung von Tumorerkrankungen dar. Hierfür ist es von Bedeutung den Mechanismus und ihre Beteiligung an zellulären Prozessen näher zu charakterisieren.

5.1 MBD2 bindet an den *HTRA1*-Promotor in Kolonkarzinomzellen

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst ein möglicher Mechanismus analysiert werden, welcher die Genexpression von *HTRA1* in Kolonkarzinomzelllinien reguliert. In vorherigen Arbeiten wurde gezeigt, dass der *HTRA1*-Promotor in den Kolonkarzinomzellen HCT116 eine Hypermethylierung der DNA aufweist und diese Beobachtung mit einer stark erniedrigten *HTRA1*-Genexpression korreliert (Dissertation I. Irle). Im Vergleich hierzu zeigte die SW480 Kolonkarzinomzelllinie keine Hypermethylierung der Promotorregion. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass *HTRA1* in den HCT116-Zellen epigenetisch herunterreguliert wird. Eine DNA-Hypermethylierung der Promotorregion ist häufig bei Genen vorzufinden, deren chromosomale Bereiche in malignen Zellen einen Verlust der Heterozygotität aufweisen (*loss of heterozygosity*) (Jones and Baylin, 2002). Dies ist auch bereits für *HTRA1* beschrieben (Chien et al., 2004a). Als möglicher Mediator wurde das DNA-Methyl-bindende Protein MBD2 identifiziert. Zum einen ist *HTRA1* als hochreguliertes Gen in *Mbd2*^{-/-} Mäusen beschrieben worden (Prof. Alan Clarke, Universität Cardiff), und zum anderen führte der *knockdown* von *MBD2* über eine transfizierte shRNA zur gesteigerten Genexpression von *HTRA1* in HCT116-Zellen (Dissertation I. Irle). Die Mitglieder der MBD-Proteinfamilie stehen im Zusammenhang mit einer DNA-methylabhängigen Genrepression in Tumorzellen (Lai and Wade, 2011) und der *knockdown* von *Mbd2* führte im *Apc*^{Min}-

Mausmodell zu einem verringerten intestinalen Tumorwachstum (Sansom et al., 2003). Die eingeführte Mutation im *APC*-Gen ist auch bei Patienten zu finden, welche an familiärer Adenomatöser Polyposis (FAP) leiden und mit hoher Wahrscheinlichkeit Darmtumore entwickeln. Die *Apc*^{Min}-Mäuse ahmen durch die frühe Entwicklung von Darmpolypen diesen Krankheitsverlauf nach. Mehrere Arbeitsgruppen haben MBD2 bereits in Verbindung mit der Genrepression von Tumorsuppressorgenen gebracht, welche eine erhöhte DNA-Methylierung in Karzinomzelllinien aufweisen (Lopez-Serra et al., 2006), hierzu zählen die Bindungen an Promotoren von *P14/P16* (Magdinier and Wolffe, 2001), *14-3-3 σ* (Pulukuri and Rao, 2006), *BAI1* (Zhu et al., 2011) und *GSTP1* (Lin and Nelson, 2003). Um eine direkte Bindung von MBD2 an den *HTRA1*-Promoter zu untersuchen, wurden Chromatin-Immunpräzipitationen durchgeführt und die Anreicherung von MBD2 zwischen den beiden Kolonkarzinomzelllinien verglichen. Zusätzlich wurde die Acetylierung von Lysin 9 am Histon H3 (H3K9ac) untersucht. Diese Modifikation ist ein Marker für transkriptionsaktives Chromatin und korreliert nicht mit einer gleichzeitigen Bindung von MBD2 (Günther et al., 2013).

Die ChIP-Daten zeigen eine signifikante Anreicherung von MBD2 am *HTRA1*-Promotor in den HCT116-Zellen im Vergleich zu den SW480-Zellen (Abb. 4-7 b)). Bisher wurde keine spezifische Sequenz als Bindestelle für MBD2 beschrieben, lediglich ein erhöhtes Vorkommen von CCG- und CGC-Sequenzen, welche tendenziell sehr häufig in CpGI vorkommen, wurden als mögliches MBD2-Bindemotif beschrieben (Chatagnon et al., 2011). Deshalb konnte auf der Basis der Sequenz des *HTRA1*-Promotors keine Vorhersage über eine evtl. Bindung von MBD2 getroffen werden. MBD2 bindet jedoch bevorzugt am Transkriptionsstart (TSS) eines Gens, hier wurde der Bereich von 700 bp *upstream* bis 200 bp *downstream* des TSS identifiziert, wobei eine hohe Anreicherung zwischen 0 und 200 bp *downstream* des TSS gezeigt wurde (Chatagnon et al., 2011). Der in der vorliegenden Arbeit analysierte Promotorbereich deckt diese Region komplett ab und die Ergebnisse unterstützen die Beobachtung, dass MBD2 in der Nähe des TSS von *HTRA1* bindet. Die hier verwendeten ChIP-qPCR-*Primer* umspannen die Region von -785 bp bis +825 bp der *HTRA1*-Promotorregion (Abb. 4-7 a)), und der Sequenzbereich bei -425 bp zeigte im Vergleich der beiden Zelllinien den größten Unterschied in der Anreicherung von MBD2 (Abb. 4-7 b)), sodass die Bindung von MBD2 in der Nähe der *HTRA1*-TSS liegt. Die Auswahl der zu verwendeten *Primer* war sehr gering, da es sich hier um eine stark CpG-reiche DNA-Sequenz handelt. Ausgewählte *Primer*-Paare, welche direkt am TSS lagen, hatten in der durchgeführten ChIP-qPCR keine auswertbaren Signale gegeben.

Die ChIP-Experimente zeigen eine signifikante Anreicherung von MBD2 am *HTRA1*-Promotor in den HCT116-Zellen. Im geringeren Maße wurde das MBD2-Protein auch am *HTRA1*-Locus in den SW480-Zellen detektiert (Abb. 4-7 b)). MBD2 besitzt eine sehr hohe Spezifität für methylierte DNA, wie es für die HCT116-Zellen gezeigt wurde. Es wurde jedoch auch eine methylenabhängige Bindung von MBD2 an aktive Promotorbereiche und *Enhancer*-Elemente beschrieben, welche u.a. mit aktiven Histonmodifikationen (H3K4me1 und H3K27ac) versehen waren (Baubec et al., 2013). Eine andere Arbeit hatte keine positive Korrelation bezüglich der Bindung von MBD2 und weiteren aktiven Histonmodifikationen, wie H3K4me3 und H3K9ac, gefunden (Günther et al., 2013). Daher spricht die hier gezeigte stark erhöhte Acetylierung von H3K9 in den SW480-Zellen eher dafür (Abb. 4-7 c)), dass in diesen Zellen keine Bindung von MBD2 am *HTRA1*-Promotor stattfindet.

Die Bindung von MBD2 resultiert u.a. in einer Rekrutierung des NuRD-Repressorkomplexes (Zhang et al., 1999). Dieser Komplex besteht aus mehreren Chromatin *Remodeling* und Histon-modifizierenden Faktoren, welche alle zur Genrepression beitragen und im Allgemeinen die Tumorprogression begünstigen (Lai and Wade, 2011). MBD2 ist aber auch als Interaktionspartner von transkriptionsaktivierenden Komplexen identifiziert worden. Hierbei führt die Bindung von MBD2 an unmethylierte CRE-Elemente (cyclic AMP-responsive Element) zur Aktivierung der Transkription (Fujita et al., 2003). Über zukünftige ChIP-Experimente könnte eine potentielle Bindung weiterer Proteine an den *HTRA1*-Promotor analysiert werden, wodurch dann auch ein möglicher zelltypspezifischer Mechanismus der *HTRA1*-Genregulation näher beschrieben werden könnte.

Vorherige Untersuchungen hatten gezeigt, dass die Behandlung der HCT116-Zellen mit Trichostatin A (TSA), einem Inhibitor von Histondeacetylasen (HDAC), nur zu einer gering erhöhten Genexpression von *HTRA1* führen. Die Behandlung mit dem Nukleosid-Analog 5-Aza-2-Deoxycytidin (5-Aza) hingegen führte zu einer deutlichen Reexpression von *HTRA1* und die Kombination beider Substanzen hatte wiederum eine leichte Erhöhung zur Folge (Dissertation I. Irle). Die Hemmung der HDACs und die daraus resultierende Erhöhung von acetylierten Aminosäureresten der Histone sind daher nicht ausreichend für eine Reexpression von *HTRA1*. Die Ergebnisse lassen eine synergistische Wirkung der DNA-Methylierung und Histondeacetylierung vermuten. Dieser Effekt ist bereits für mehrere hypermethylierte Gene in Tumorzelllinien beschrieben worden (Cameron et al., 1999; Suzuki et al., 2002). Zusammenfassend mit den Daten aus den ChIP-Analysen, kann nun postuliert werden, dass die Genrepression von *HTRA1* in der HCT116-Kolonkarzinomzelllinie jedoch primär über DNA-Methylierung und der Bindung von MBD2 zu erklären ist.

5.2 Der *HTRA3*-Promotor ist in Kolonkarzinomzellen hypermethyliert

Neben der von *HTRA1* sind auch aberrante Genexpressionen von *HTRA2* und *HTRA3* in mehreren Tumorarten beschrieben worden (Narkiewicz et al., 2008; Narkiewicz et al., 2009b; Narkiewicz et al., 2008). Die Genexpression kann auf verschiedenen Ebenen reguliert werden. So verläuft der klassische Weg der Genexpression über die Bindung von Transkriptionsfaktoren. Für *HTRA1* wurde gezeigt, dass die Transkriptionsfaktoren AP-2 α (*adaptor-related protein complex 2 alpha*) und SRF (*serum response factor*) an den Promotor binden können, und zusätzlich wurde das Vorhandensein von Bindestellen für Transkriptionsfaktoren der Sp-Familie (*specifity protein*) vorhergesagt (Dewan et al., 2006). Der *HTRA2*-Promoter besitzt mögliche Bindestellen für SP1, AP-2, ELK-1 und NRF-2 (*nuclear factor erythroid 2*). Lediglich für *HTRA3* sind bisher keine Transkriptionsfaktoren identifiziert worden. Neben der Bindung von Transkriptionsfaktoren können auch epigenetische Mechanismen für die transkriptionelle Regulation verantwortlich sein. Für die Genexpression von *HTRA1* ist eine Regulation über DNA-Methylierung und MBD2 als potentieller Mediator gezeigt worden (4.1.5). Anknüpfend an diese Analysen wurden die Promotorregionen von *HTRA2* und *HTRA3* in den Kolonkarzinomzelllinien untersucht, um auch hier der Frage nachzugehen, ob ihre Transkription einer epigenetisch bedingten Regulation unterliegt.

Zunächst wurden über *in silico*-Analysen sowohl für *HTRA2* als auch für *HTRA3* eine potentielle CpGI innerhalb ihrer Promotorregion identifiziert (Abb. 4-2). Die CpGI am *HTRA2*-Promotor erstreckt sich von -716 bp bis 791 bp, die am *HTRA3*-Promotor von -322 bp bis 441 bp. In nicht-transformierten Zellen kolokalisieren CpGI typischerweise mit transkriptionellen aktiven Promotorregionen und innerhalb der DNA-Sequenz weisen sie keine Methylierung der Cytosine auf (Deaton and Bird, 2011). Die Methylierungsanalyse an jeweils zwei Bereichen der *HTRA*-CpGI in den Kolonkarzinomzelllinien hat ergeben, dass der *HTRA2*-Promotor in beiden Zelllinien beinahe methylierungsfrei vorliegt, wohingegen der *HTRA3*-Promotor in den HCT116-Zellen einer fast 100%igen DNA-Methylierung unterliegt (Abb. 4-3 und Abb. 4-4). Die Genexpressionsanalysen zeigen eine positive Korrelation abhängig vom Grad der DNA-Methylierung. Die *HTRA2*-Genexpression unterscheidet sich in beiden Zelllinien nicht signifikant voneinander und die *HTRA3*-Genexpression ist lediglich in der HCT116-Zelllinie stark vermindert (Abb. 4-1).

Der hypomethylierte Promotor und die unveränderte Genexpression von *HTRA2* in beiden Zelllinien sprechen dafür, dass *HTRA2* während der Tumorprogression im Kolonkarzinom keiner epigenetisch bedingten transkriptionellen Veränderung unterliegt. Im Gegensatz zu Promotoren von zelltypspezifisch Genen weisen diese von ubiquitär exprimierten Genen tendenziell einen höheren Anteil an CpG-Dinukleotiden auf (Landolin et al., 2010). Diese CpG-reichen Promotoren werden zudem häufig von Transkriptionsfaktoren wie SP1, NRF-1 und Mitglieder der ETS-Familie (ELK-1) reguliert (Landolin et al., 2010), sowie es ebenfalls für *HTRA2* beschrieben ist. Im Gegensatz hierzu steht die Hypermethylierung des Promotors und verminderte Genexpression von *HTRA3* in den HCT116-Zellen. Eine verminderte *HTRA3*-Genexpression ist bisher in Zelllinien aus dem Ovarial- (Narkiewicz et al., 2008), Endometrial- (Narkiewicz et al., 2009a) und Lungenkarzinom (Beleford et al., 2010a; Beleford et al., 2010b) beschrieben worden. In Lungenkarzinomzelllinien führt die geringe *HTRA3*-Genexpression zu einer zellulären Resistenz gegenüber der Behandlung mit Chemotherapeutika, die Erhöhung von *HTRA3* wiederum zur Induktion der Apoptose und zusätzlich liegt in diesen Zellen eine Hypermethylierung des Promotors vor (Beleford et al., 2010b). Gleiche Funktionen und Beobachtungen sind für das *HTRA1*-Gen im Ovarialkarzinom beschrieben (Chien et al., 2006). Dies unterstützt die Hypothese, dass *HTRA1* und *HTRA3* ähnliche biologische Funktionen aufweisen, jedoch zelltypspezifisch reguliert werden (De Luca et al., 2004; Nie et al., 2003a).

Die aus dieser Arbeit hervorgegangenen Ergebnisse zeigen die DNA-Hypermethylierung und Verminderung der Genexpression des *HTRA1*- und *HTRA3*-Gens in den HCT116-Kolonkarzinomzelllinien. Vergleichend hierzu weisen die *HTRA*-Gene in den SW480-Kolonkarzinomzelllinien keine DNA-Methylierung und keine Veränderungen in ihren Genexpressionen auf. Dies könnte zum einen über den Unterschied in ihrem Genotyp zu erklären sein. Die SW480-Zellen tragen eine Mutation im *TP53*-Gen, welche in der DNA-Bindedomäne zu einem Aminosäureaustausch von Arginin zu Histidin führt und die Interaktion zur DNA beeinträchtigt. Im Laufe der Tumorgenese sind verschiedene Mutationen notwendig, welche die Progression zur malignen Transformation fördern. Diese können sich innerhalb von verschiedenen Tumorgeweben stark unterscheiden. Zum anderen weisen die im Labor kultivierte Zelllinien im Allgemeinen eine deutlich höhere DNA-Methylierung ihrer CpG-Dinukleotide auf, als sie im vergleichenden primären Gewebe zu finden ist (Smiraglia et al., 2001). Die vermehrt auftretende Hypermethylierung scheint hier kein Charakteristikum der Tumorerkrankung zu sein, sondern wird als eine Folge der Zellkultivierung beschrieben, sodass möglicherweise der kombinierte Verlust von *HTRA1* und *HTRA3* nicht im primären kolorektalen Tumorgewebe auftritt. Für Ovarialkarzinomzelllinien ist kein Verlust bei der

HTRA-Genexpression beschrieben. Hier korreliert der Verlust von *HTRA3* mit einer Erhöhung der mRNA von *HTRA1* (Chien et al., 2004b). Für die molekulare Charakterisierung der epigenetischen Regulation von *HTRA3* und Analyse ihrer biologischen Funktion stellen die Zellkulturlinien trotzdem ein essentielles Hilfsmittel dar. Denn es bleibt noch weiter zu klären, ob und welcher Mediator an der Genrepression von *HTRA3* beteiligt ist. Der *knockdown* von MBD2 führt nur in einer von zwei transfizierten Zelllinien zur gesteigerten *HTRA3*-Genexpression (Abb. 4-5), sodass hier möglicherweise andere MBD-Proteine zur Genrepression beitragen oder auch die Funktion von MBD2 komplementieren. Da bisher keine Transkriptionsfaktoren für *HTRA3* identifiziert wurden, ist auch eine Genregulation über Transkriptionsfaktoren möglich, welche an methylierte Cytosine binden können. Dieser Fragestellung kann in Zukunft mit Hilfe der HCT116-Kolonkarzinomzelllinie nachgegangen werden.

5.3 In den Melanomzellen wird die Genexpression von *HTRA1* nicht epigenetisch reguliert

Die hier präsentierten Ergebnisse zeigen, dass *HTRA1* in einer Kolonkarzinomzelllinie transkriptionell epigenetisch reguliert wird. Die Tatsache, dass diese Analyse mit den über Jahrzehnte kultivierten HCT116-Zelllinien durchgeführt ist, erfordert die Untersuchung an primären Zellen, um die Frage nach einer klinischen Bedeutung zu beantworten. Eine verminderte *HTRA1*-Genexpression ist u.a. im Melanom beschrieben (Baldi et al., 2002). Über die Hautklinik am Universitätsklinikum in Essen (Prof. D. Schadendorf) wurden uns 13 primäre Melanom-Zelllinien zur näheren Charakterisierung der *HTRA1*-Genexpression und zellulären Funktion von *HTRA1* zur Verfügung gestellt. Zuvor durchgeführte Genexpressionsanalysen an diesen Zelllinien hatten *HTRA1* als gering exprimiertes Gen identifiziert.

Die quantitative Bestimmung der mRNA von *HTRA1* über qPCR-Analysen zeigt eine recht heterogene Verteilung innerhalb der verschiedenen Zelllinien im Vergleich zur Menge der *HTRA2*-mRNA (Abb. 4-9). Die Unterschiede in der *HTRA1*-Genexpression können in diesem Fall nicht über eine erhöhte DNA-Methylierung erklärt werden (Abb. 4-10 und Abb. 4-11). Ebenso ist keine Korrelation zum jeweiligen Genotyp der Melanom-Zelllinien zu erkennen, wobei für eine statistisch signifikante Aussage eine höhere Anzahl an Zelllinien untersucht werden müsste.

Die Melanom-Zelllinie Nr. 012b zeigt im Vergleich zu den weiteren Zelllinien die niedrigste *HTRA1*-Genexpression und den höchsten Grad an detektierter DNA-Methylierung. Zudem ist diese Zelllinie durch ihre teilweise in Suspension wachsende Eigenschaft aufgefallen. Alle weiteren Melanom-Zelllinien zeigen ein komplett adhärentes Zellwachstum. Dies spricht dafür, dass der beinahe komplette Verlust von *HTRA1* in der Zelllinie Nr. 012b zu einer Zellproliferation führen könnte, welche unabhängig von Zell-Matrix- bzw. Zell-Zell-Kontakten ist. Eine Beobachtung, die für eine äußerst aggressive Tumorphorogression spricht. Ein Zellkontakt-unabhängiges Zellwachstum korreliert auch in Ovarialkarzinomzelllinien mit einer Erniedrigung der *HTRA1*-Genexpression (He et al., 2010). Über ein *Rescue*-Experiment (Reexpression von *HTRA1*) könnte überprüft werden, ob *HTRA1* auch in dieser Melanom-Zelllinie eine ähnliche Funktion aufweist.

Neben der DNA-Hypermethylierung am Promotorbereich übt auch die Deacetylierung von Aminosäureresten der Histone einen repressiven Effekt auf die Genexpression aus. So steigt in Brustkarzinomzelllinien die *HTRA1*-Genexpression als Folge einer Behandlung mit TSA deutlich an, wohingegen die Hemmung von DNA-Methyltransferasen keinen Effekt zeigt (Wang et al., 2012). Auch diese Zelllinien zeigen vergleichend zu den hier gezeigten Methylierungsanalysen (Abb. 4-11) nur eine partielle DNA-Methylierung am *HTRA1*-Promotor. Ob auch in den hier verwendeten Melanom-Zelllinien die *HTRA1*-Genexpression über eine alleinige Hemmung der HDACs erhöht werden kann, ließe sich durch eine TSA-Behandlung der Zellen überprüfen.

Neben epigenetischen Regulationsmechanismen spielen im Melanom auch genetische Veränderungen eine große Rolle. Es sind zahlreiche Punktmutationen, wie auch Deletionen bzw. Amplifikationen von Genen im Melanom identifiziert (Dahl and Guldborg, 2007). Dabei tritt der Verlust des kompletten Chromosoms 10 besonders häufig im Gehirn-, Lungen-, Ovarial- und Hautkarzinom auf (Mertens et al., 1997) und in etwa 30-60 % ist eine Monosomie von Chromosom 10 im nicht-familiär bedingten Melanom vorzufinden (Newton, 1994). Der partielle oder auch komplette chromosomale Verlust findet hierbei primär am langen Arm von Chromosom 10 (10q) statt (Richmond et al., 1986), wohingegen nur wenig zytogenetische Veränderungen am kurzen Arm von Chromosom 10 (10p) beschrieben sind (Robertson et al., 1999). Zytogenetische Abberationen und der Verlust der Heterozygosität sind häufig im Bereich 10q22-qter lokalisiert (Herbst et al., 1994). In dieser Region befindet sich an der Position 10q23.31 die genetische Informationen für die *PTEN*-Phosphatase (*Phosphatase and Tensin homolog*). *PTEN* ist ein Tumorsuppressorgen, welches als Mitspieler im PI3/AKT-Signalweg das Zellwachstum negativ beeinflusst und im Melanom zu

etwa 30-40 % eine fehlende Funktionalität aufweist (Guldberg et al., 1997). Weiterhin steht insbesondere der Verlust der chromosomalen Region von 10q24 bis 10q26 im Zusammenhang mit einer frühen malignen Transformation von Melanozyten (Parmiter et al., 1988). Interessanterweise wird in diesem Segment für das *HTRA1*-Gen codiert (10q26.13). Dies unterstützt die Vermutung, dass auch die *HTRA1*-Genexpression im Melanom über chromosomale Deletionen Veränderungen unterliegt. Der partielle bzw. komplette Verlust von 10q im Melanom anstelle einzelner Punktmutationen spricht dafür, dass auf dem Chromosom 10 weitere Gene lokalisiert sind, welche in Kombination mit dem Verlust von *PTEN* die Tumorgenese fördern (Robertson et al., 1999). Aufgrund der tumorsuppressiven Eigenschaften und chromosomalen Position stellt *HTRA1* ein mögliches dieser Gene dar.

Der funktionelle sowie chromosomale Verlust von *PTEN* ist in kultivierten Zelllinien häufiger zu beobachten als im Vergleich zu direkt entnommenem Tumormaterial (37% zu 6% bzw. 21% zu 2%) (Pollock et al., 2002). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass der Verlust von *PTEN* unter den *in vitro*-Bedingungen den Zelllinien einen selektiven Wachstumsvorteil bietet, sowie es im Melanom auch für *CDKN2A* beschrieben ist (Pollock et al., 2002). Somit ist auch in den Melanom-Zelllinien eine *in vitro*-bedingte Verminderung der *HTRA1*-Genexpression nicht auszuschließen.

5.4 Zelluläre Verteilung von HTRA1 in Melanomzellen

Neben den möglichen verschiedenen Regulationsmechanismen der *HTRA1*-Genexpression sind auch Unterschiede in der zellulären Verteilung von *HTRA1* beschrieben. Dabei ist *HTRA1* sowohl extrazellulär als auch intrazellulär nachgewiesen worden (De Luca et al., 2004), wovon bis zu 80% außerhalb der Zelle vorkommen (Grau et al., 2005). Bisher beschriebene Substrate und Bindepartner für *HTRA1* bestätigen das extra- und intrazelluläre Vorkommen der *HTRA1*-Protease. So wurde u.a. TGF- β als extrazelluläres Substrat (Launay et al., 2008) und Tubulin und TSC2 als intrazelluläre Bindepartner bzw. Substrat identifiziert (Campioni et al., 2010; Chien et al., 2009). Eine Kolokalisation von überexprimiertem *HTRA1* an Mikrotubuli wurde auch über vorherige Lokalisationsanalysen in den neuronalen Zelllinien SHSY5Y (S. Pöpsel) und U373 (A. Tenstädt) nachgewiesen, wobei möglicherweise die mittels Überexpression herbeigeführte erhöhte Menge an *HTRA1* zusätzlich zu einem vesikulären Vorkommen von *HTRA1* geführt hatte.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Melanom-Einzelzellklone mit erhöhter *HTRA1*-Expression verwendet (Nr. 60-1, 60-9 und 66-6) und am konfokalen Lasermikroskop

ausgewertet, um die Lokalisation von HTRA1 in Melanomzellen zu untersuchen. Interessanterweise ist dabei eine Genotypspezifische Verteilung von HTRA1 beobachtet worden (Abb. 4-18). Die WT-Melanom-Zelllinie (Nr. 60-1) weist eine primär intrazellulär faserartige Lokalisation von HTRA1 auf, wohingegen in der NRAS Q61K mutierten Zelllinie (Nr. 60-9) zusätzlich zu der am Zellrand gebündelten Struktur eine teils diffuse und teils vesikelartige Verteilung im Zellinneren zu erkennen ist. Eine sehr deutlich ausgeprägte vesikelartige Lokalisation ist schließlich in dem BRAF V600E Einzelzellklon (Nr. 66-6) zu beobachten. Zusätzlich ist in diesem Zellklon häufig eine punktförmige Ansammlung von HTRA1 am Zellkern vorhanden. In allen drei Einzelzellklonen befindet sich HTRA1 in geringem Maße auch im extrazellulären Raum. Die faserartige Verteilung im WT-Hintergrund spricht dafür, dass HTRA1 im Melanom ebenfalls an das Mikrotubuli-Netzwerk bindet. Eine eindeutige Kolokalisation ließe sich über eine Kofärbung von Tubulin und HTRA1 zeigen. Die Unterschiede in der zellulären Verteilung von HTRA1 in den weiteren Zellklonen lassen vermuten, dass hierfür die konstitutive Aktivierung der ERK-Signalkaskade eine Rolle spielen könnte. Die intrazellulären Vesikel könnten Golgi-Vesikel darstellen, welche für den Proteintransport verantwortlich sind und das vermehrte Auftreten von HTRA1 in diesen Vesikeln kann daher für einen Sekretionsdefekt sprechen. Eine weitere mögliche Erklärung stellt die Interaktion von HTRA1 zu BRAF (5.5) und möglicherweise weiteren Proteinen der ERK-Signalkaskade dar. Die zellulär örtliche Lokalisation der Signalkaskade wird u.a. über *scaffold*-Proteine vermittelt, wobei z.B. SEF-1 (*similar expression to FGF*) für die Kolokalisation aktivierter MEK/ERK Komplexe zum Golgi-Transportsystem verantwortlich ist (Torii et al., 2004). Außerdem ist eine vermehrte vesikuläre Lokalisation für phosphoryliertes MEK beschrieben worden (Kranenburg et al., 1999), welches auch in den BRAF V600E Zellen deutlich erhöht ist (Abb. 4-37). Somit könnte eine mögliche Bindung von HTRA1 zur ERK-Signalkaskade für die vesikuläre Lokalisation verantwortlich sein. Ob es sich bei den beobachteten Vesikeln um Golgi-Vesikel handelt und ob eine Kolokalisation mit HTRA1 vorliegt, könnte über eine Kofärbung bzw. Koimmunpräzipitation mit HTRA1 und spezifischen Golgi-Markerproteinen (z.B. Golgin-97) überprüft werden. Zusätzlich würde eine Kofärbung mit γ -Tubulin Aufschluss darüber geben, ob es sich bei dem punktförmigen HTRA1-Vorkommen am Zellkern um eine Kolokalisation mit Centrosomen handelt. Eine Kolokalisation von HTRA1 und γ -Tubulin ist bisher in Ovarialkarzinomzellen nachgewiesen worden (Chien et al., 2009).

5.5 BRAF als neuer Interaktionspartner von HTRA1 in Melanomzellen

Um weitere Informationen über die funktionelle Bedeutung von HTRA1 im Melanom zu erhalten, wurden *in vitro* und zellbiologische Interaktionsanalysen durchgeführt. Ein Peptid-Binde-Assay hatte Hinweise auf eine Interaktion zwischen HTRA1 und RAF-Proteinen geliefert. Hierbei wurde die Bindungsaffinität der PDZ-Domäne von HTRA1 an über 6000 C-Termini humaner Proteine analysiert. Die C-Termini von CRAF (TLTTSPRLPVF) und BRAF (QAGGYGAFPVH) weisen durch ihre Position an 283 bzw. 475 eine Bindungsaffinität auf und stellen potentielle Interaktionspartner von HTRA1 dar. In Krebszellen zeigt HTRA1 Funktionen in der Apoptose, Zellmigration und Chemotherapie-induzierten Zytotoxizität (Chien et al., 2006; Chien et al., 2009), wobei geringe Informationen über den molekularen Mechanismus bekannt sind. Die potentiellen RAF-Interaktionspartner sind zwei Hauptspieler im ERK-Signalweg, daher besteht die Möglichkeit, dass HTRA1 in diesem Signalweg involviert ist und so zelluläre Prozesse regulieren könnte.

5.5.1 Die CRAF-RBD und BRAF-Kinase-Domäne sind *in vitro*-Interaktionspartner für HTRA1

Zunächst wurde die Bindung von HTRA1 an rekombinante RAF-Proteine überprüft. Hierfür wurden zwei relevante Domänen der humanen RAF-Proteine in *E. coli* überexprimiert und gereinigt (Abb. 4-20 und Abb. 4-21). Über GST-Pulldown Assays konnte gezeigt werden, dass HTRA1 sowohl an die rekombinante RBD von CRAF als auch an die Kinase-Domäne von BRAF bindet (Abb. 4-23). Beide Protein-Domänen weisen untereinander eine hohe Homologie auf, sodass HTRA1 möglicherweise mit beiden RAF-Proteinen interagiert. Obwohl keine Bindung an das GST-Protein nachgewiesen wurde (Abb. 4-26), könnte über GST-freie RAF-Proteine eine mögliche unspezifische Bindung von HTRA1 an den fusionierten GST-Tag noch überzeugender ausgeschlossen werden. Dieses Experiment würde auch die Möglichkeit ausschließen, dass HTRA1 an die Linker-Region bindet, welche sich zwischen dem GST und der RBD (SDLVPRGS) bzw. der Kinase-Domäne (SDLVPRGSPNSRVDM) befindet (hydrophobe Aminosäuren sind durch einen Unterstrich markiert). Es ist hier anzumerken, dass HTRA1 bevorzugt C-Termini von Proteinen, die hydrophobe Aminosäuren enthalten, bindet (Runyon et al., 2007). Die GST-Pulldown Assays haben allerdings gezeigt, dass die Bindung von HTRA1 zu den jeweiligen RAF-Domänen unabhängig vom Vorhandensein der PDZ-Domäne auftritt (Abb. 4-25). Bei dem in dieser Arbeit eingesetzten HTRA1 handelt es sich um die Δ mac-Variante (Deletion des

N-Terminus), sodass beim Verwenden von HTRA1 Δ mac Δ PDZ lediglich die Protease-Domäne von HTRA1 an der Bindung zu den RAF-Domänen beteiligt sein kann. Die hier gezeigten Experimente schließen jedoch eine zusätzliche Beteiligung der PDZ-Domäne nicht aus. Dies lässt vermuten, dass die Bindung von HTRA1 zu seinen Zielproteinen über eine kombinierte Spezifität der verschiedenen Domänen vermittelt wird. So bindet TGF- β an die Protease-Domäne von HTRA1 (Oka et al., 2004), wohingegen die PDZ-Domäne für den Abbau von Kollagen (Murwantoko et al., 2004) und die Bindung an Tubulin essentiell ist (Chien et al., 2009). In der Arbeit von Murwantoko und Kollegen wurde zusätzlich gezeigt, dass die Bindung von Peptiden an die PDZ-Domäne zu einer erhöhten proteolytischen Aktivität von HTRA1 führt (Murwantoko et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit ist jedoch keine Aktivitätssteigerung von HTRA1 nach Inkubation der synthetischen BRAF- bzw. CRAF-Peptide zu erkennen (Abb. 4-27). Obwohl hier die Bindung der Peptide an die PDZ-Domäne von HTRA1 noch mittels isothermer Kalorimetrie überprüft werden sollte, sprechen die gezeigten Ergebnisse für eine Protease-vermittelte Interaktion. Eine über die Protease-Domäne vermittelte Bindung wird durch den *in vitro* durchgeführten proteolytischen Verdau der RBD von HTRA1 unterstützt (Abb. 4-34). Für die proteolytische Aktivität scheint jedoch wiederum die PDZ-Domäne eine Rolle zu spielen. Hieran anknüpfende Arbeiten zeigen, dass HTRA1 Δ mac Δ PDZ nicht in der Lage ist die RBD abzubauen (nicht gezeigte Daten von J. Nelles). Zusammenfassend lassen die *in vitro*-Daten eine bisher nicht beschriebene zelluläre Funktion von HTRA1 über eine Interaktion zu RAF-Proteinen vermuten. In weiteren Untersuchungen sollte die Interaktion zwischen RBD und HTRA1 auch unter zusätzlicher Zugabe von RAS durchgeführt werden. GTP-beladene RAS-Proteine binden an die RBD von RAF, rekrutieren dieses zur Plasmamembran und sorgen für die Aktivierung von RAF. Ein trimerer Komplex bestehend aus HTRA1, RBD und RAS würde für eine Interaktion im aktivierten ERK-Signalweg sprechen.

5.5.2 Endogenes HTRA1 und BRAF interagieren in Melanom-Zelllinien

Um weitere Informationen über eine physiologische Funktion von HTRA1 im Zusammenhang mit RAF zu erhalten, wurden zellbiologische Interaktionsanalysen durchgeführt. Die Bindung von zellulär überexprimiertem HTRA1 zu den rekombinant hergestellten RAF-Domänen (Abb. 4-30) und die Koimmunpräzipitation von endogenem HTRA1 und BRAF (Abb. 4-31 und Abb. 4-32) bestätigen eine intrazelluläre Interaktion der beiden Proteine. Diese Interaktion ist unabhängig vom Genotyp der Melanomzellen, da weder eine konstitutive Aktivierung von NRAS (NRAS Q61K) noch BRAF (BRAF V600E) zu einer Änderung der präzipitierten Proteinmenge führt. Eine Interaktion zwischen HTRA1 und NRAS, welches im

ERK-Signalweg an die RBD bindet und eine Aktivierung von RAF vermittelt, ist in den Melanom-Zelllinien weder mittels Immunpräzipitationen noch Immunfluoreszenz-Analysen detektiert worden (Abb. 4-31 und Abb. 4-33). Ebenso konnte in den Immunpräzipitationen keine Interaktion zwischen HTRA1 und CRAF bestätigt werden (nicht gezeigte Daten). Eine vollständige Aktivierung von RAF wird neben mehreren Phosphorylierungsschritten über die Bildung von Heterodimeren zwischen BRAF und CRAF erreicht (Rushworth et al., 2006), sodass ein trimere Komplex bestehend aus HTRA1, BRAF und CRAF wiederum für eine aktivitäts-abhängige Interaktion im ERK-Signalweg sprechen könnte. Die Interaktion zwischen HTRA1 und BRAF ist zusätzlich über Immunfluoreszenz-Analysen bestätigt worden, da diese in fixierten Melanomzellen eine Kolokalisation beider Proteine zeigen (Abb. 4-33). Die Kolokalisation zeigt keine Anreicherung der Proteine an der Zellmembran, wo die RAS-abhängige Aktivierung von RAF stattfindet. Da HTRA1 und BRAF überwiegend intrazellulär kolokalisieren ist über die Immunfluoreszenz-Aufnahmen kein direkter Zusammenhang zwischen der Aktivierung von BRAF und der Interaktion zu HTRA1 gegeben. Zudem ist die Kolokalisation unabhängig vom Genotyp der Melanom-Zelllinien vorhanden. Zusätzlich üben die unterschiedlichen HTRA1-Expressionen in den Einzelzellklonen der Melanomzellen keinen Effekt auf die Phosphorylierungszustände der Kinasen MEK und ERK aus (Abb. 4-37), sodass bisher keine über HTRA1-vermittelte Änderung in der Aktivierung der ERK-Signalkaskade zu erkennen ist.

Eine weitere zelluläre Funktion der Interaktion zwischen HTRA1 und BRAF könnte der proteolytische Abbau von BRAF durch HTRA1 darstellen. Die Immundetektionen von HTRA1 und BRAF der Melanom-Einzelzellklone hatten keine Verringerung der Proteinmenge von BRAF in Abhängigkeit von der HTRA1-Expression gezeigt (Abb. 4-16). Um diese Hypothese näher zu überprüfen sollten die Melanomzellen mit dem Translationshemmer Cycloheximid behandelt werden. Da nach der Zugabe von Cycloheximid keine *de novo* Proteinsynthese mehr stattfindet, würde eine HTRA1-abhängige Degradation zu einer Verringerung in der Proteinmenge von BRAF führen.

Weiterhin könnte aus formalen Gründen spekuliert werden, dass HTRA1 als ein Substrat für BRAF dient. Bisher sind keine posttranslationale Modifikationen von HTRA1 identifiziert worden und zudem stellen die beiden MEK-Kinasen die einzig anerkannten Substrate für BRAF dar. Für CRAF sind jedoch weitere potentielle Substrate beschrieben, dazu gehören das Retinoblastom (RB) (Wang et al., 1998), die Myosin Phosphatase MYPT (Broustas et al., 2002) und das Cardiale Troponin T (Pfleiderer et al., 2009). Für die mitochondriale HTRA-Protease HTRA2 sind zwei Serine als potentielle Phosphorylierungsstellen charakterisiert

worden (S142 und S400). In der Arbeit von Plun-Favreu und Kollegen ist eine über P38 vermittelte Phosphorylierung von HTRA2 gezeigt worden (Plun-Favreau et al., 2007). Ein Aminosäuren-Sequenzvergleich der HTRA1 und HTRA2 Proteinsequenzen zeigt eine Homologie der beiden identifizierten Phosphorylierungsstellen. Wobei in der Proteinsequenz von HTRA1 das Serin an Position 400 (HTRA2) durch ein Threonin (T421) ersetzt ist. Eine *in vitro* Inkubation von rekombinantem HTRA1 und der BRAF-Kinase-Domäne und eine anschließende Massenspektrometrische Analyse der Produkte könnte Hinweise über posttranslationale Modifizierungen von HTRA1 geben, welche über die Serin-Threonin Kinase BRAF katalysiert werden.

Eine phosphorylierungsabhängige Interaktion zwischen HTRA1 und BRAF sollte aufgrund der zahlreichen Phosphorylierungsstellen an BRAF in Erwägung gezogen werden. Eine Behandlung der Melanomzellen mit Okadainsäure, einem Phosphatase-Inhibitor, hatte erste Hinweise auf eine fehlende Bindung von HTRA1 zu BRAF gegeben (nicht gezeigte Daten).

In dieser Arbeit ist BRAF als neuer Interaktionspartner für HTRA1 identifiziert worden. In folgenden zellbiologischen Untersuchungen sollte mit Hilfe von Deletionsmutanten beider Proteine die relevanten Bindungsdomänen bestimmt werden, sodass eine potentielle Funktion der Interaktion näher charakterisiert werden kann.

5.6 Das Proliferationsverhalten der Melanom-Einzelzellklone nach Hemmung von BRAF bzw. MEK und der Einfluss von HTRA1

Die Herunterregulation der *HTRA1*-Genexpression ist in verschiedenen Tumorgeweben beschrieben (Baldi et al., 2002; Shridhar et al., 2002) und steht u.a. mit einer erhöhten Zellproliferation in Melanomzellen und einer Resistenz gegenüber Chemotherapeutika in Verbindung (Baldi et al., 2002; Chien et al., 2006). Desweiteren zeigen embryonale *Htra1*^{-/-} - Mausfibroblasten eine deutlich gesteigerte Zellproliferation im Vergleich zu *Htra1*^{+/+} - Mausfibroblasten (Dissertation N. Schmidt). HTRA1 könnte somit die Zellproliferation negativ beeinflussen und das Tumorwachstum im Zusammenspiel mit anderen Faktoren regulieren. Deshalb sollte in dieser Arbeit der Einfluss von HTRA1 auf das Wachstum von Melanomzellen analysiert werden. Hierbei sollte insbesondere überprüft werden, ob die unterschiedlichen HTRA1-Mengen das Proliferationsverhalten der Einzelzellklone beeinflussen, nachdem in diesen mittels einem molekularen BRAF- und MEK-Inhibitor die ERK-Signalkaskade unterbrochen wurde.

Der verwendete Inhibitor PLX4032 ist spezifisch für die BRAF V600E Mutation, da dieser Inhibitor eine erhöhte Bindungsaffinität aufweist für BRAF V600E im Vergleich zu BRAF und CRAF. Interessanterweise führt eine fehlende Mutation im BRAF-Protein oder auch eine konstitutiv aktive Mutation im RAS-Protein zur Aktivierung des ERK-Signalweges (Halaban et al., 2010; Joseph et al., 2010). Auf molekularer Ebene ist dieser Effekt über eine Transaktivierung der RAF-Dimere zu erklären, welche aufgrund der Bindung von PLX4032 ausgelöst werden. Das Inhibitor-gebundene Monomer wird hierbei inaktiviert, wohingegen das nicht vom Inhibitor gebundene Monomer eine verstärkte Kinase-Aktivität und RAF-Dimerisierung aufweist (Poulikakos et al., 2010). Ebenso führt eine konstitutive Aktivierung der RAS-Proteine (z.B. über NRAS Q61K) zu einer erhöhten CRAF-Dimerisierung, sodass auch in diesem Fall unter einer PLX4032-Zugabe keine Hemmung im ERK-Signalweg zu erkennen ist. In Zellen, die eine BRAF V600E Mutation tragen, wird das aktiv vorliegende BRAF-Protein mit einer hohen Spezifität von PLX4032 gebunden und inhibiert. Bei der Substanz GSK1120212 (GSK) handelt es sich um einen allosterischen Hemmer der Kinasen MEK1 und MEK2, welcher nicht nur die MEK-abhängige Phosphorylierung von ERK hemmt sondern auch die durch RAF vermittelte Phosphorylierung an MEK1 (S217) verhindert (Gilmartin et al., 2011).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Proliferationsexperimente zeigen, dass der zu erwartende proliferationsfördernde Effekt bei fehlendem HTRA1 in dem Einzelzellklon mit WT-Hintergrund (Nr. 60-2) zu beobachten ist. Das Gegenteil ist bei Einzelzellklonen, die eine NRAS- (Nr. 60-9) oder BRAF-Mutation (Nr. 66-6) tragen, zu beobachten. Hier ist die Proliferation von Zellen, die HTRA1 höher exprimieren, erhöht (Abb. 4-39). Die Zugabe der oben beschriebenen Inhibitoren wirkt sich ebenfalls sehr unterschiedlich auf die verschiedenen Melanom-Einzelzellklone aus, daher werden diese im Einzelnen diskutiert.

Die WT-Zellen (Nr. 60-1 und 60-2) weisen geringe Mengen an GTP-beladenem RAS (RAS-GTP) auf (Abb. 4-28) und folglich auch weniger RAF-Dimere. PLX4032 weist eine geringere Affinität für WT-RAF-Monomere auf und zugleich steigert der Inhibitor die Transaktivierung der RAF-Dimere, welche zu einer erhöhten Phosphorylierung von MEK führt (Hatzivassiliou et al., 2010). Daher sollte die Behandlung mit PLX4032 in den WT-Zellen eher zu einem gesteigerten Zellwachstum führen. Der Zellindex ist jedoch nicht wesentlich gestiegen und in der Zelllinie Nr. 60-2 ist sogar eine geringe Abnahme zu erkennen (Abb. 4-38 a)). Das Modell der oben beschriebenen Dimer-Transaktivierung ist bei geringen Konzentrationen von PLX4032 zu beobachten, wobei erhöhte Konzentration schließlich auch zu einer Hemmung von BRAF WT führen. Daher ist zu vermuten, dass hier

die hohe Konzentration an PLX4032 zu dem beobachteten Effekt geführt hat. Die Behandlung mit dem MEK-Inhibitor GSK führt zu einem drastischen Abfall im Zellwachstum. Dies spricht dafür, dass in den WT-Zellen die katalytische Aktivität von MEK über GSK gehemmt werden kann. Interessanterweise führt hier eine erhöhte HTRA1-Expression in der Nr. 60-1 nach etwa 24 h zu einem erneuten Wachstum der Zellen, welches über die kombinierte Behandlung mit PLX4032 wiederum verhindert wird. Der über GSK herbeigeführte Verlust der MEK-Aktivität führt zu einer fehlenden Aktivierung von ERK und somit auch zum Verlust eines negativen Rückkopplungsmechanismus. Lito und Kollegen hatten gezeigt, dass es hierdurch zu einer erhöhten Sensitivität für Wachstumsfaktoren kommt und eine gesteigerte Reaktivierung des Signalweges erfolgt (Lito et al., 2012). Dies könnte eine mögliche Erklärung für die nach 24 h beobachtete erhöhte Zellproliferation sein. Eine verringerte HTRA1-Expression im Einzelzellklon Nr. 60-2 erhöht die Sensitivität gegenüber dem eingesetzten MEK-Inhibitor. Daher ist es von großem Interesse in Zukunft zu klären, ob HTRA1 für diesen Effekt direkt verantwortlich ist und die Interaktion von HTRA1 zu BRAF hierbei eine Rolle spielt.

Die Behandlung der Melanom-Einzelzellklone mit PLX4032 führt in den NRAS-mutierten Zellen zu einer Abnahme des Zellindex (Abb. 4-38 b)). Dieser Befund war nicht zu erwarten, weil eine konstitutive RAS-Aktivierung und somit vermehrte Bildung von RAF-Dimeren zu einer Resistenz gegenüber PLX4032 führen sollte (Nazarian et al., 2010) und zudem die Aktivität von CRAF durch PLX4032 in NRAS mutierten Zellen gesteigert wird (Halaban et al., 2010). Eine Immundetektion von phosphoryliertem MEK könnte nähere Hinweise über den molekularen Hintergrund des beobachteten Effektes geben. Die Behandlung mit GSK führt allerdings wie erwartet zu einer Hemmung der Zellproliferation. Die unterschiedlichen Mengen an HTRA1-Protein in den beiden Zellklonen (Nr. 60-9 und 60-3) üben keinen Effekt auf die Abnahme des Zellwachstums aus. Die Daten lassen vermuten, dass sowohl PLX4032 als auch GSK den ERK-Signalweg unter diesen Bedingungen hemmen.

Die PLX4032-Behandlung führt in den BRAF V600E Einzelzellklonen zu keiner starken Abnahme des Zellwachstums (Abb. 4-38 c)). Das unveränderte Zellwachstum kann über das Fehlen von PTEN auf Proteinebene in diesen Zellen erklärt werden. Der Verlust von PTEN führt zu einer fehlenden negativen Regulation des PI3K/AKT Signalweges und somit zur Aktivierung der Zellproliferation und dem Zellüberleben. Die Hemmung der ERK-Signalkaskade wird dabei über den aktiven PI3K/AKT-Signalweg kompensiert (Xing et al., 2012). Weiterhin können aber auch alternative Spleißvarianten von BRAF (p61-BRAF) (Poulikakos et al., 2011), eine Überexpression von CRAF (Montagut et al., 2008) oder

Mutationen im MEK-Protein (Wagle et al., 2011) zu einer PLX4032-Resistenz führen. Resistenzen gegenüber verschiedenen RAF-Inhibitoren sind für Melanomzellen beschrieben, welche zusätzlich zur Mutation im BRAF-Protein (V600E) noch MEK-Mutationen (MEK K59del und MEK Q56P) besitzen (Emery et al., 2009; Greger et al., 2012). Diesen Möglichkeiten könnte mit Hilfe von Genotypisierungen und qPCR-Analysen in Zukunft nachgegangen werden. Eine weitere Auffälligkeit zeigen die beiden BRAF V600E Einzelzellklone nach der Zugabe von GSK. Die Hemmung der MEK Kinase führt in den ersten 24 h zu einem drastischen Anstieg im Zellwachstum. Diese Beobachtung spricht ebenfalls für vorliegende MEK-Mutationen. Eine kombinierte Behandlung bestehend aus BRAF- und MEK-Inhibitor hat eine erhöhte Sensitivität und Reduktion des Zellwachstums zur Folge (Greger et al., 2012). Die Proliferationsdaten zeigen vergleichbare Ergebnisse und lassen vermuten, dass die Hemmung an zwei Schritten im ERK-Signalweg effektiver ist, um die Proliferation in Tumorzellen zu verringern. Die erhöhte HTRA1-Expression im Einzelzellklon Nr. 66-6 führt unter der Zugabe von PLX4032 zu einer erhöhten Sensitivität, sodass möglicherweise eine mutationsspezifische Bindung von HTRA1 an BRAF V600E zum Effekt beiträgt. Es sind regulatorische Interaktionen zwischen BRAF und Chaperonen bzw. *scaffold*-Proteinen beschrieben, so bindet z.B. HSP90 spezifisch an BRAF V600E und erhöht dadurch die Proteinstabilität (Grbovic et al., 2006). Um eine mutationsspezifische Interaktion zwischen HTRA1 und BRAF V600E in Zukunft näher zu untersuchen, könnte z.B. ein mutationsspezifischer BRAF-Antikörper in Immunpräzipitationen eingesetzt werden.

Zusammenfassend entsprechen die Proliferationsdaten nur teilweise den bereits bekannten Mechanismen. Es sollte jedoch berücksichtigt werden, dass es sich hierbei zum einen um transformierte Tumorzellen handelt, zum anderen die Einzelzellklone aus einer heterogenen Tumormasse stammen und letztendlich auch der ERK-Signalweg keiner geradlinigen Kaskade folgt. Die Zellproliferation wird über das Zusammenwirken mehrerer Signalwege und dem Vorhandensein von unterschiedlichen Mutationen beeinflusst. Um HTRA1 als weiteren Regulationsfaktor mit einzubeziehen, sollten zudem weitere Melanom-Einzelzellklone analysiert werden. Außerdem wäre es wichtig, in Zellen, die geringe Mengen an HTRA1 exprimieren, durch ein *Rescue*-Experiment erhöhte Mengen von HTRA1 einzustellen. Umgekehrt sollte HTRA1 in Zellen, welche hohe Mengen der Protease exprimieren, z.B. mit Hilfe von siRNA reduziert werden. Auf diesem Wege könnten in Zukunft HTRA1-spezifische Effekte näher charakterisiert werden.

6 Zusammenfassung

Die HtrA-Proteine (*high temperature requirement A*) gehören zu einer Familie von hochkonservierten Serin-Proteasen, die sowohl Mitglieder in Prokaryonten als auch in Eukaryonten aufweisen. Die Genexpression und Funktionen der beiden humanen Proteasen HTRA1 und HTRA3 sind in Verbindung mit mehreren Tumorarten gebracht worden. Dabei findet häufig eine Herunterregulation der Genexpression von *HTRA1* oder *HTRA3* statt, welche zum Teil über epigenetische Mechanismen vermittelt wird. Funktionell werden der HTRA1-Protease tumorsuppressive Eigenschaften zugesprochen, da das Fehlen von *HTRA1* u.a. zu einer erhöhten Zellmigration, einem gesteigerten Zellüberleben und einer Resistenz gegenüber Chemotherapeutika führt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels Chromatin-Immunpräzipitationen in den HCT116-Kolonkarzinomzellen das DNA-methyl-bindende Protein MBD2 als Mediator für epigenetisches *Silencing* der *HTRA1*-Genexpression identifiziert. Zudem weist der *HTRA1*-Promoter in diesen Tumorzellen eine geringe Acetylierung von Lysin9 am Histon H3, einem Marker für transkriptionell aktives Chromatin, auf. Diese Ergebnisse korrelieren zum einen mit der verringerten *HTRA1*-Genexpression und zum anderen mit der potentiellen CpG-Insel und DNA-Hypermethylierung am *HTRA1*-Promotor. Anhand dieser Ergebnisse kann die Hypothese aufgestellt werden, dass primär die Bindung von MBD2 an hypermethylierte Bereiche der Transkriptionsstartstelle von *HTRA1* für die reprimierte Genexpression verantwortlich ist.

Desweiteren wurde über *in silico*-Analysen am *HTRA2*- und *HTRA3*-Promotor jeweils eine potentielle CpG-Insel identifiziert. Wobei der *HTRA2*-Promotor weder in den HCT116- noch in den SW480-Kolonkarzinomzellen einer DNA-Methylierung unterliegt, weist der *HTRA3*-Promotor in den HCT116-Zellen eine starke Methylierung auf. Der Grad der DNA-Methylierung korreliert bei beiden Genen mit der über qPCR quantifizierten Genexpression. Es konnte jedoch nicht geklärt werden, ob MBD2 für die verringerte Genexpression von *HTRA3* in den HCT116-Zellen verantwortlich ist. Es ist davon auszugehen, dass weitere MBD-Proteine oder auch posttranslationale Histonmodifikationen für die Regulation der *HTRA3*-Genexpression eine Rolle spielen.

Zusätzlich wurde in einem weiteren Tumorgewebe die *HTRA1*-Genexpression untersucht. Es wurde in mehreren primären humanen Melanom-Zelllinien eine heterogene Genexpression von *HTRA1* gezeigt, jedoch lassen die durchgeführten Methylierungs-Analysen keine

Regulation über eine erhöhte DNA-Methylierung erkennen. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass die Regulation der Genexpression von *HTRA1* in verschiedenen Tumorgeweben unterschiedlichen Mechanismen unterliegen kann. Daher sollte in Zukunft geklärt werden, ob in den Melanomzellen eher chromosomale Veränderungen im *HTRA1*-Gen eine Rolle für die Genregulation spielen.

Mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie wurde die zelluläre Verteilung von HTRA1 in den Melanomzellen untersucht. Hierbei waren zum einen eine überwiegend intrazelluläre Lokalisation und zum anderen eine vom Genotyp der Melanomzellen abhängige Verteilung von HTRA1 zu erkennen. In den WT-Melanomzellen war HTRA1 als eine faserartige Struktur zu erkennen. Die konstitutive Aktivierung der ERK-Signalkaskade über mutiertes NRAS bzw. BRAF scheint hingegen eine vesikelartige Lokalisation von HTRA1 zu begünstigen.

Desweiteren konnte in den Melanomzellen eine Protein-Protein-Interaktion zwischen HTRA1 und BRAF nachgewiesen werden. Mithilfe von *in vitro* GST-Pulldown Assays wurde eine Bindung von HTRA1 sowohl an die Ras-Bindedomäne als auch an die Kinase-Domäne von CRAF bzw. BRAF gezeigt und über Immunpräzipitationen und konfokaler Lasermikroskopie wurde die Interaktion zwischen endogenem HTRA1 und BRAF in den Melanomzellen bestätigt. Die funktionelle Bedeutung dieser Interaktion konnte in dieser Arbeit nicht bestimmt werden. Die zahlreichen Phosphorylierungsstellen an BRAF lassen jedoch die Vermutung zu, dass posttranslationale Modifikationen bei der Bindung eine Rolle spielen. Außerdem wurde die RAS-Bindedomäne als ein *in vitro*-Substrat für HTRA1 identifiziert. Daher sollte geklärt werden, ob BRAF auch *in vivo* ein Substrat für HTRA1 darstellt.

Mit Hilfe von FACS-Analysen und Proliferationsexperimenten konnten weitere Hinweise auf funktionelle Eigenschaften von HTRA1 gewonnen werden. So scheint HTRA1 zum einen eine Rolle bei der Chromosomenamplifikation zu spielen. Die Behandlung der Melanomzellen mit einem RAF- bzw. MEK-Inhibitor lässt desweiteren die Vermutung zu, dass die Sensitivität gegenüber pharmakologischen Inhibitoren der ERK-Signalkaskade über die HTRA1-Menge beeinflusst werden könnte.

In dieser Arbeit wurden Melanom-Einzelzellklone generiert, welche sich in ihrem BRAF bzw. NRAS Genotyp und in ihrer HTRA1-Menge unterscheiden. Die Generierung und zellbiologische Charakterisierung der Einzelzellklone stellt eine wichtige Grundlage für weiterführende Experimente dar. Mit Hilfe dieser primären Melanomzellen kann in Zukunft der Frage weiter nachgegangen werden, welche Rolle HTRA1 in der Tumorprogression spielt. Hierbei steht insbesondere die Beteiligung von HTRA1 im ERK-Signalweg im Vordergrund.

7 Abstract

The HtrA proteins (high temperature requirement A) belong to a family of serine proteases that are highly conserved from bacteria to humans. The level of gene expression and the functions of the human proteases HTRA1 and HTRA3 have been associated with several types of tumors. Frequently, there is a downregulation of *HTRA1* or *HTRA3* gene expression, which is in part regulated by epigenetic mechanisms. The absence of HTRA1 leads to increased cell migration, cell survival and resistance to chemotherapy. Collectively, these results suggest that *HTRA1* may function as a tumor suppressor.

In this work, the DNA methyl-binding protein MBD2 has been identified as a mediator of epigenetic silencing of the *HTRA1* gene in HCT116 colon cancer cells by using chromatin immunoprecipitation. In addition, the *HTRA1* promoter was associated with a reduced acetylation of histone H3 at Lysin 9, which is a marker for transcriptionally active chromatin. These results correlated with a decrease in *HTRA1* expression, the presence of a potential CpG island and DNA hypermethylation of the *HTRA1* promoter. These results indicate that the reduced expression of *HTRA1* is caused primarily by MBD2 binding to hypermethylated regions of the transcription start site of *HTRA1*.

A potential CpG island at the *HTRA2* and *HTRA3* promoter was identified by *in silico* analyses. While the *HTRA2* promoter was mostly unmethylated at the CpGs in HCT116 and SW480 colon cancer cells, the *HTRA3* promoter contained a high amount of methylated cytosines in HCT116 cells. Here, the degree of DNA methylation correlated with the gene expression as quantified by RT-qPCT. However, it could not be shown whether MBD2 is responsible for the decreased expression of *HTRA3* and it is expected that the gene expression is regulated by additional MBD proteins or post-translational histone modifications.

Additionally, the *HTRA1* expression was analyzed in primary human melanoma cell lines. The *HTRA1* gene showed a heterogenous expression pattern in different cell lines. However, methylation analyses almost excluded an epigenetic mechanism of gene regulation. The results suggest that the *HTRA1* expression may be differently regulated in different tumor tissues. Therefore, it should be clarified if chromosomal changes in the *HTRA1* gene may play a role in the gene regulation in melanoma cells.

Using confocal laser microscopy, the cellular distribution of HTRA1 was examined in melanoma cells. It was found that HTRA1 was predominantly localized intracellularly. Additionally a genotype-dependent distribution of HTRA1 was observed. In WT melanoma

cells, HTRA1 showed a fiber-like distribution. In contrast, the cell lines containing a constitutive activation of the ERK signaling pathway by mutated NRAS or BRAF seemed to favor a vesicle-like localization of the HTRA1 protein.

Furthermore, a protein-protein interaction between HTRA1 and BRAF could be detected in melanoma cells. Using an *in vitro* GST pull-down assay it was shown that recombinant HTRA1 binds to the Ras-binding domain and the kinase domain of CRAF and BRAF, respectively. Immunoprecipitation experiments and confocal laser microscopy confirmed an interaction between endogenous HTRA1 and BRAF in melanoma cells. The functional significance of this interaction could not be determined in this work. However, the numerous phosphorylation sites in the BRAF protein lead to the assumption that post-translational modifications play a role in the interaction with HTRA1. In addition, the RAS-binding domain has been identified as an *in vitro* substrate for HTRA1. Therefore, it should be further clarified whether BRAF is an *in vivo* substrate of HTRA1.

Further insights into the function of HTRA1 were obtained by using FACS analysis and cell proliferation assays. It seemed that HTRA1 plays a role in chromosome amplification. The treatment of melanoma cells with an RAF or MEK inhibitor gave further evidence that the sensitivity to pharmacological inhibitors of the ERK pathway could be influenced by the levels of HTRA1 protein.

In this work melanoma single cell clones were generated, which differed in their *BRAF* or *NRAS* genotype and in their HTRA1 levels. The generation and functional characterization of these single cell clones is an important basis for further experiments. In the future, the role of HTRA1 in tumor progression can be investigated by using these primary melanoma cells.

Literaturverzeichnis

- Adams, J.M., and Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 26, 1324-1337.
- Bachman, K.E., Park, B.H., Rhee, I., Rajagopalan, H., Herman, J.G., Baylin, S.B., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (2003). Histone modifications and silencing prior to DNA methylation of a tumor suppressor gene. *Cancer Cell* 3, 89-95.
- Baldi, A., De Luca, A., Morini, M., Battista, T., Felsani, A., Baldi, F., Catricalà, C., Amantea, A., Noonan, D.M., Albini, A., *et al.* (2002). The HtrA1 serine protease is down-regulated during human melanoma progression and represses growth of metastatic melanoma cells. *Oncogene* 21, 6684-6688.
- Baldi, A., Mottolese, M., Vincenzi, B., Campioni, M., Mellone, P., Di Marino, M., di Crescenzo, V.G., Visca, P., Menegozzo, S., Spugnini, E.P., *et al.* (2008). The serine protease HtrA1 is a novel prognostic factor for human mesothelioma. *Pharmacogenomics* 9, 1069-1077.
- Ballestar, E., Paz, M.F., Valle, L., Wei, S., Fraga, M.F., Espada, J., Cigudosa, J.C., Huang, T.H.M., and Esteller, M. (2003). Methyl-CpG binding proteins identify novel sites of epigenetic inactivation in human cancer. *Embo Journal* 22, 6335-6345.
- Ballestar, E., and Wolffe, A.P. (2001). Methyl-CpG-binding proteins. Targeting specific gene repression. *Eur J Biochem* 268, 1-6.
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., and Zhao, K. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129, 823-837.
- Baubec, T., Ivánek, R., Lienert, F., and Schübeler, D. (2013). Methylation-dependent and -independent genomic targeting principles of the MBD protein family. *Cell* 153, 480-492.
- Beleford, D., Liu, Z., Rattan, R., Quagliuolo, L., Boccellino, M., Baldi, A., Maguire, J., Staub, J., Molina, J., and Shridhar, V. (2010a). Methylation induced gene silencing of HtrA3 in smoking-related lung cancer. *Clin Cancer Res* 16, 398-409.
- Beleford, D., Rattan, R., Chien, J., and Shridhar, V. (2010b). High temperature requirement A3 (HtrA3) promotes etoposide- and cisplatin-induced cytotoxicity in lung cancer cell lines. *J Biol Chem* 285, 12011-12027.
- Bennett, D.C. (1993). Genetics, development, and malignancy of melanocytes. *Int Rev Cytol* 146, 191-260.
- Bergman, Y., and Cedar, H. (2013). DNA methylation dynamics in health and disease. *Nat Struct Mol Biol* 20, 274-281.
- Berx, G., and van Roy, F. (2009). Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1, a003129.
- Bestor, T., Laudano, A., Mattaliano, R., and Ingram, V. (1988). Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases. *J Mol Biol* 203, 971-983.
- Bhowmick, N.A., Neilson, E.G., and Moses, H.L. (2004). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 432, 332-337.

- Blasco, M.A. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet* 6, 611-622.
- Bock, C., Reither, S., Mikeska, T., Paulsen, M., Walter, J., and Lengauer, T. (2005). BiQ Analyzer: visualization and quality control for DNA methylation data from bisulfite sequencing. *Bioinformatics* 21, 4067-4068.
- Bondeva, T., Balla, A., Várnai, P., and Balla, T. (2002). Structural determinants of Ras-Raf interaction analyzed in live cells. *Mol Biol Cell* 13, 2323-2333.
- Bowden, M.A., Di Nezza-Cossens, L.A., Jobling, T., Salamonsen, L.A., and Nie, G. (2006). Serine proteases HTRA1 and HTRA3 are down-regulated with increasing grades of human endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 103, 253-260.
- Broustas, C.G., Grammatikakis, N., Eto, M., Dent, P., Brautigan, D.L., and Kasid, U. (2002). Phosphorylation of the myosin-binding subunit of myosin phosphatase by Raf-1 and inhibition of phosphatase activity. *J Biol Chem* 277, 3053-3059.
- Bryan, T.M., Englezou, A., Dalla-Pozza, L., Dunham, M.A., and Reddel, R.R. (1997). Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nat Med* 3, 1271-1274.
- Bryan, T.M., Englezou, A., Gupta, J., Bacchetti, S., and Reddel, R.R. (1995). Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J* 14, 4240-4248.
- Burkhardt, D.L., and Sage, J. (2008). Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer* 8, 671-682.
- Cameron, E.E., Bachman, K.E., Myöhänen, S., Herman, J.G., and Baylin, S.B. (1999). Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet* 21, 103-107.
- Campioni, M., Severino, A., Manente, L., Tuduce, I.L., Toldo, S., Caraglia, M., Crispi, S., Ehrmann, M., He, X., Maguire, J., *et al.* (2010). The serine protease HtrA1 specifically interacts and degrades the tuberous sclerosis complex 2 protein. *Mol Cancer Res* 8, 1248-1260.
- Chang, F., Steelman, L.S., Lee, J.T., Shelton, J.G., Navolanic, P.M., Blalock, W.L., Franklin, R.A., and McCubrey, J.A. (2003). Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia* 17, 1263-1293.
- Chatagnon, A., Perriaud, L., Nazaret, N., Croze, S., Benhattar, J., Lachuer, J., and Dante, R. (2011). Preferential binding of the methyl-CpG binding domain protein 2 at methylated transcriptional start site regions. *Epigenetics* 6, 1295-1307.
- Chien, J., Aletti, G., Baldi, A., Catalano, V., Muretto, P., Keeney, G.L., Kalli, K.R., Staub, J., Ehrmann, M., Cliby, W.A., *et al.* (2006). Serine protease HtrA1 modulates chemotherapy-induced cytotoxicity. *J Clin Invest* 116, 1994-2004.
- Chien, J., Ota, T., Aletti, G., Shridhar, R., Boccellino, M., Quagliuolo, L., Baldi, A., and Shridhar, V. (2009). Serine protease HtrA1 associates with microtubules and inhibits cell migration. *Mol Cell Biol* 29, 4177-4187.
- Chien, J., Staub, J., Hu, S.I., Erickson-Johnson, M.R., Couch, F.J., Smith, D.I., Crowl, R.M., Kaufmann, S.H., and Shridhar, V. (2004a). A candidate tumor suppressor HtrA1 is downregulated in ovarian cancer. *Oncogene* 23, 1636-1644.

- Chien, J., Staub, J., Hu, S.I., Erickson-Johnson, M.R., Couch, F.J., Smith, D.I., Crowl, R.M., Kaufmann, S.H., and Shridhar, V. (2004b). A candidate tumor suppressor HtrA1 is downregulated in ovarian cancer. *Oncogene* 23, 1636-1644.
- Clark, W.H., Elder, D.E., Guerry, D., Epstein, M.N., Greene, M.H., and Van Horn, M. (1984). A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol* 15, 1147-1165.
- Clausen, T., Southan, C., and Ehrmann, M. (2002). The HtrA family of proteases: implications for protein composition and cell fate. *Mol Cell* 10, 443-455.
- Cohen, C., Zavala-Pompa, A., Sequeira, J.H., Shoji, M., Sexton, D.G., Cotsonis, G., Cerimele, F., Govindarajan, B., Macaron, N., and Arbiser, J.L. (2002). Mitogen-activated protein kinase activation is an early event in melanoma progression. *Clin Cancer Res* 8, 3728-3733.
- Collisson, E.A., De, A., Suzuki, H., Gambhir, S.S., and Kolodney, M.S. (2003). Treatment of metastatic melanoma with an orally available inhibitor of the Ras-Raf-MAPK cascade. *Cancer Res* 63, 5669-5673.
- Cooper, D.N., Taggart, M.H., and Bird, A.P. (1983). Unmethylated domains in vertebrate DNA. *Nucleic Acids Res* 11, 647-658.
- Cross, S.H., Meehan, R.R., Nan, X., and Bird, A. (1997). A component of the transcriptional repressor MeCP1 shares a motif with DNA methyltransferase and HRX proteins. *Nat Genet* 16, 256-259.
- Cummins, D.L., Cummins, J.M., Pantle, H., Silverman, M.A., Leonard, A.L., and Chanmugam, A. (2006). Cutaneous malignant melanoma. *Mayo Clin Proc* 81, 500-507.
- Dahl, C., and Guldberg, P. (2007). The genome and epigenome of malignant melanoma. *APMIS* 115, 1161-1176.
- Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., *et al.* (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417, 949-954.
- De Luca, A., De Falco, M., De Luca, L., Penta, R., Shridhar, V., Baldi, F., Campioni, M., Paggi, M.G., and Baldi, A. (2004). Pattern of expression of HtrA1 during mouse development. *J Histochem Cytochem* 52, 1609-1617.
- De Luca, A., De Falco, M., Severino, A., Campioni, M., Santini, D., Baldi, F., Paggi, M.G., and Baldi, A. (2003). Distribution of the serine protease HtrA1 in normal human tissues. *J Histochem Cytochem* 51, 1279-1284.
- Deaton, A.M., and Bird, A. (2011). CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev* 25, 1010-1022.
- Dewan, A., Liu, M., Hartman, S., Zhang, S.S., Liu, D.T., Zhao, C., Tam, P.O., Chan, W.M., Lam, D.S., Snyder, M., *et al.* (2006). HTRA1 promoter polymorphism in wet age-related macular degeneration. *Science* 314, 989-992.
- Dhillon, A.S., Hagan, S., Rath, O., and Kolch, W. (2007). MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 26, 3279-3290.
- Dumaz, N., Hayward, R., Martin, J., Ogilvie, L., Hedley, D., Curtin, J.A., Bastian, B.C., Springer, C., and Marais, R. (2006). In melanoma, RAS mutations are accompanied by switching signaling from BRAF to CRAF and disrupted cyclic AMP signaling. *Cancer Res* 66, 9483-9491.

- Dunham, M.A., Neumann, A.A., Fasching, C.L., and Reddel, R.R. (2000). Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat Genet* 26, 447-450.
- Emery, C.M., Vijayendran, K.G., Zipser, M.C., Sawyer, A.M., Niu, L., Kim, J.J., Hatton, C., Chopra, R., Oberholzer, P.A., Karpova, M.B., *et al.* (2009). MEK1 mutations confer resistance to MEK and B-RAF inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 20411-20416.
- Esposito, V., Campioni, M., De Luca, A., Spugnini, E.P., Baldi, F., Cassandro, R., Mancini, A., Vincenzi, B., Groeger, A., Caputi, M., *et al.* (2006). Analysis of HtrA1 serine protease expression in human lung cancer. *Anticancer Res* 26, 3455-3459.
- Faccio, L., Fusco, C., Chen, A., Martinotti, S., Bonventre, J.V., and Zervos, A.S. (2000). Characterization of a novel human serine protease that has extensive homology to bacterial heat shock endoprotease HtrA and is regulated by kidney ischemia. *J Biol Chem* 275, 2581-2588.
- Fatemi, M., and Wade, P.A. (2006). MBD family proteins: reading the epigenetic code. *Journal of Cell Science* 119, 3033-3037.
- Feinberg, A.P., and Vogelstein, B. (1983). Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 301, 89-92.
- Flaherty, K.T. (2006). Chemotherapy and targeted therapy combinations in advanced melanoma. *Clin Cancer Res* 12, 2366s-2370s.
- Fujita, H., Fujii, R., Aratani, S., Amano, T., Fukamizu, A., and Nakajima, T. (2003). Antithetic effects of MBD2a on gene regulation. *Mol Cell Biol* 23, 2645-2657.
- Furuta, J., Umebayashi, Y., Miyamoto, K., Kikuchi, K., Otsuka, F., Sugimura, T., and Ushijima, T. (2004). Promoter methylation profiling of 30 genes in human malignant melanoma. *Cancer Sci* 95, 962-968.
- Garbe, C., and Leiter, U. (2009). Melanoma epidemiology and trends. *Clin Dermatol* 27, 3-9.
- Gardiner-Garden, M., and Frommer, M. (1987). CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* 196, 261-282.
- Garrington, T.P., and Johnson, G.L. (1999). Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 11, 211-218.
- Gibney, E.R., and Nolan, C.M. (2010). Epigenetics and gene expression. *Heredity (Edinb)* 105, 4-13.
- Gilmartin, A.G., Bleam, M.R., Groy, A., Moss, K.G., Minthorn, E.A., Kulkarni, S.G., Rominger, C.M., Erskine, S., Fisher, K.E., Yang, J., *et al.* (2011). GSK1120212 (JTP-74057) is an inhibitor of MEK activity and activation with favorable pharmacokinetic properties for sustained in vivo pathway inhibition. *Clin Cancer Res* 17, 989-1000.
- Goel, V.K., Lazar, A.J., Warneke, C.L., Redston, M.S., and Haluska, F.G. (2006). Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol* 126, 154-160.
- Grau, S., Baldi, A., Bussani, R., Tian, X., Stefanescu, R., Przybylski, M., Richards, P., Jones, S.A., Shridhar, V., Clausen, T., *et al.* (2005). Implications of the serine protease HtrA1 in amyloid precursor protein processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 6021-6026.
- Grau, S., Richards, P.J., Kerr, B., Hughes, C., Caterson, B., Williams, A.S., Junker, U., Jones, S.A., Clausen, T., and Ehrmann, M. (2006). The role of human HtrA1 in arthritic disease. *J Biol Chem* 281, 6124-6129.

- Gray, C.W., Ward, R.V., Karran, E., Turconi, S., Rowles, A., Viglienghi, D., Southan, C., Barton, A., Fantom, K.G., West, A., *et al.* (2000). Characterization of human HtrA2, a novel serine protease involved in the mammalian cellular stress response. *Eur J Biochem* 267, 5699-5710.
- Grbovic, O.M., Basso, A.D., Sawai, A., Ye, Q., Friedlander, P., Solit, D., and Rosen, N. (2006). V600E B-Raf requires the Hsp90 chaperone for stability and is degraded in response to Hsp90 inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 57-62.
- Greger, J.G., Eastman, S.D., Zhang, V., Bleam, M.R., Hughes, A.M., Smitheman, K.N., Dickerson, S.H., Laquerre, S.G., Liu, L., and Gilmer, T.M. (2012). Combinations of BRAF, MEK, and PI3K/mTOR inhibitors overcome acquired resistance to the BRAF inhibitor GSK2118436 dabrafenib, mediated by NRAS or MEK mutations. *Mol Cancer Ther* 11, 909-920.
- Greger, V., Passarge, E., Höpping, W., Messmer, E., and Horsthemke, B. (1989). Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. *Hum Genet* 83, 155-158.
- Guldborg, P., Thor Straten, P., Birck, A., Ahrenkiel, V., Kirkin, A.F., and Zeuthen, J. (1997). Disruption of the MMAC1/PTEN gene by deletion or mutation is a frequent event in malignant melanoma. *Cancer Res* 57, 3660-3663.
- Günther, K., Rust, M., Leers, J., Boettger, T., Scharfe, M., Jarek, M., Bartkuhn, M., and Renkawitz, R. (2013). Differential roles for MBD2 and MBD3 at methylated CpG islands, active promoters and binding to exon sequences. *Nucleic Acids Res* 41, 3010-3021.
- Halaban, R., Zhang, W., Bacchiocchi, A., Cheng, E., Parisi, F., Ariyan, S., Krauthammer, M., McCusker, J.P., Kluger, Y., and Sznol, M. (2010). PLX4032, a selective BRAF(V600E) kinase inhibitor, activates the ERK pathway and enhances cell migration and proliferation of BRAF melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res* 23, 190-200.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
- Hancock, J.F. (2003). Ras proteins: different signals from different locations. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 373-384.
- Hara, K., Shiga, A., Fukutake, T., Nozaki, H., Miyashita, A., Yokoseki, A., Kawata, H., Koyama, A., Arima, K., Takahashi, T., *et al.* (2009). Association of HTRA1 mutations and familial ischemic cerebral small-vessel disease. *N Engl J Med* 360, 1729-1739.
- Harikrishnan, K.N., Chow, M.Z., Baker, E.K., Pal, S., Bassal, S., Brasacchio, D., Wang, L., Craig, J.M., Jones, P.L., Sif, S., *et al.* (2005). Brahma links the SWI/SNF chromatin-remodeling complex with MeCP2-dependent transcriptional silencing. *Nat Genet* 37, 254-264.
- Harris, B.Z., and Lim, W.A. (2001). Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *J Cell Sci* 114, 3219-3231.
- Hatzivassiliou, G., Song, K., Yen, I., Brandhuber, B.J., Anderson, D.J., Alvarado, R., Ludlam, M.J., Stokoe, D., Gloor, S.L., Vigers, G., *et al.* (2010). RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature* 464, 431-435.

- He, X., Ota, T., Liu, P., Su, C., Chien, J., and Shridhar, V. (2010). Downregulation of HtrA1 promotes resistance to anoikis and peritoneal dissemination of ovarian cancer cells. *Cancer Res* 70, 3109-3118.
- Hendrich, B., and Bird, A. (1998). Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol* 18, 6538-6547.
- Hendrich, B., Hardeland, U., Ng, H.H., Jiricny, J., and Bird, A. (1999). The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites. *Nature* 401, 301-304.
- Herbst, R.A., Weiss, J., Ehnis, A., Cavenee, W.K., and Arden, K.C. (1994). Loss of heterozygosity for 10q22-10qter in malignant melanoma progression. *Cancer Res* 54, 3111-3114.
- Hoon, D.S., Spugnardi, M., Kuo, C., Huang, S.K., Morton, D.L., and Taback, B. (2004). Profiling epigenetic inactivation of tumor suppressor genes in tumors and plasma from cutaneous melanoma patients. *Oncogene* 23, 4014-4022.
- Houben, R., Becker, J.C., Kappel, A., Terheyden, P., Bröcker, E.B., Goetz, R., and Rapp, U.R. (2004). Constitutive activation of the Ras-Raf signaling pathway in metastatic melanoma is associated with poor prognosis. *J Carcinog* 3, 6.
- Hu, S.I., Carozza, M., Klein, M., Nantermet, P., Luk, D., and Crowl, R.M. (1998). Human HtrA, an evolutionarily conserved serine protease identified as a differentially expressed gene product in osteoarthritic cartilage. *J Biol Chem* 273, 34406-34412.
- Hu, X.Y., Xu, Y.M., Chen, X.C., Ping, H., Chen, Z.H., and Zeng, F.Q. (2006). Immunohistochemical analysis of Omi/HtrA2 expression in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *APMIS* 114, 893-898.
- Hynes, N.E., and MacDonald, G. (2009). ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Curr Opin Cell Biol* 21, 177-184.
- Ikushima, H., and Miyazono, K. (2010). TGFbeta signalling: a complex web in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 10, 415-424.
- Jiang, W.Q., Zhong, Z.H., Nguyen, A., Henson, J.D., Toouli, C.D., Braithwaite, A.W., and Reddel, R.R. (2009). Induction of alternative lengthening of telomeres-associated PML bodies by p53/p21 requires HP1 proteins. *J Cell Biol* 185, 797-810.
- Jones, P.A., and Baylin, S.B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3, 415-428.
- Jorgensen, E.D., Dozmorov, I., Frank, M.B., Centola, M., and Albino, A.P. (2004). Global gene expression analysis of human bronchial epithelial cells treated with tobacco condensates. *Cell Cycle* 3, 1154-1168.
- Joseph, E.W., Pratilas, C.A., Poulikakos, P.I., Tadi, M., Wang, W., Taylor, B.S., Halilovic, E., Persaud, Y., Xing, F., Viale, A., *et al.* (2010). The RAF inhibitor PLX4032 inhibits ERK signaling and tumor cell proliferation in a V600E BRAF-selective manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 14903-14908.
- Jönsson, G., Dahl, C., Staaf, J., Sandberg, T., Bendahl, P.O., Ringnér, M., Guldberg, P., and Borg, A. (2007). Genomic profiling of malignant melanoma using tiling-resolution arrayCGH. *Oncogene* 26, 4738-4748.
- Kafri, T., Ariel, M., Brandeis, M., Shemer, R., Urven, L., McCarrey, J., Cedar, H., and Razin, A. (1992). Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line. *Genes Dev* 6, 705-714.

- Kamioka, Y., Yasuda, S., Fujita, Y., Aoki, K., and Matsuda, M. (2010). Multiple decisive phosphorylation sites for the negative feedback regulation of SOS1 via ERK. *J Biol Chem* 285, 33540-33548.
- Kim, E.K., and Choi, E.J. (2010). Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 1802, 396-405.
- Kim, H.J., and Bar-Sagi, D. (2004). Modulation of signalling by Sprouty: a developing story. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 441-450.
- King, A.J., Sun, H., Diaz, B., Barnard, D., Miao, W., Bagrodia, S., and Marshall, M.S. (1998). The protein kinase Pak3 positively regulates Raf-1 activity through phosphorylation of serine 338. *Nature* 396, 180-183.
- Kolch, W. (2005). Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 827-837.
- Kouzarides, T. (2007). SnapShot: Histone-modifying enzymes. *Cell* 131, 822.
- Kranenburg, O., Verlaan, I., and Moolenaar, W.H. (1999). Dynamin is required for the activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase by MAP kinase kinase. *J Biol Chem* 274, 35301-35304.
- Krick, S., Shi, S., Ju, W., Faul, C., Tsai, S.Y., Mundel, P., and Böttinger, E.P. (2008). Mpv17l protects against mitochondrial oxidative stress and apoptosis by activation of Omi/HtrA2 protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 14106-14111.
- Lai, A.Y., and Wade, P.A. (2011). Cancer biology and NuRD: a multifaceted chromatin remodelling complex. *Nature Reviews Cancer* 11, 588-596.
- Landolin, J.M., Johnson, D.S., Trinklein, N.D., Aldred, S.F., Medina, C., Shulha, H., Weng, Z., and Myers, R.M. (2010). Sequence features that drive human promoter function and tissue specificity. *Genome Res* 20, 890-898.
- Larsen, F., Gundersen, G., Lopez, R., and Prydz, H. (1992). CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics* 13, 1095-1107.
- Launay, S., Maubert, E., Lebeurrier, N., Tennstaedt, A., Campioni, M., Docagne, F., Gabriel, C., Dauphinot, L., Potier, M.C., Ehrmann, M., *et al.* (2008). HtrA1-dependent proteolysis of TGF-beta controls both neuronal maturation and developmental survival. *Cell Death Differ* 15, 1408-1416.
- Le Guezennec, X., Vermeulen, M., Brinkman, A.B., Hoeijmakers, W.A., Cohen, A., Lasonder, E., and Stunnenberg, H.G. (2006). MBD2/NuRD and MBD3/NuRD, two distinct complexes with different biochemical and functional properties. *Mol Cell Biol* 26, 843-851.
- Lee, S.H., Lee, J.W., Kim, H.S., Kim, S.Y., Park, W.S., Kim, S.H., Lee, J.Y., and Yoo, N.J. (2003). Immunohistochemical analysis of Omi/HtrA2 expression in stomach cancer. *APMIS* 111, 586-590.
- Lengauer, C., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1997). Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 386, 623-627.
- Lewis, J.D., Meehan, R.R., Henzel, W.J., Maurer-Fogy, I., Jeppesen, P., Klein, F., and Bird, A. (1992). Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell* 69, 905-914.
- Li, B., Carey, M., and Workman, J.L. (2007). The role of chromatin during transcription. *Cell* 128, 707-719.

- Li, L.C., and Dahiya, R. (2002). MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics* 18, 1427-1431.
- Light, Y., Paterson, H., and Marais, R. (2002). 14-3-3 antagonizes Ras-mediated Raf-1 recruitment to the plasma membrane to maintain signaling fidelity. *Mol Cell Biol* 22, 4984-4996.
- Lin, X., and Nelson, W.G. (2003). Methyl-CpG-binding domain protein-2 mediates transcriptional repression associated with hypermethylated GSTP1 CpG islands in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res* 63, 498-504.
- Lipinska, B., Sharma, S., and Georgopoulos, C. (1988). Sequence analysis and regulation of the htrA gene of *Escherichia coli*: a sigma 32-independent mechanism of heat-inducible transcription. *Nucleic Acids Res* 16, 10053-10067.
- Lito, P., Pratilas, C.A., Joseph, E.W., Tadi, M., Halilovic, E., Zubrowski, M., Huang, A., Wong, W.L., Callahan, M.K., Merghoub, T., *et al.* (2012). Relief of profound feedback inhibition of mitogenic signaling by RAF inhibitors attenuates their activity in BRAFV600E melanomas. *Cancer Cell* 22, 668-682.
- Lopez-Serra, L., Ballestar, E., Fraga, M.F., Alaminos, M., Setien, F., and Esteller, M. (2006). A profile of methyl-CpG binding domain protein occupancy of hypermethylated promoter CpG islands of tumor suppressor genes in human cancer. *Cancer Res* 66, 8342-8346.
- Magdinier, F., and Wolffe, A.P. (2001). Selective association of the methyl-CpG binding protein MBD2 with the silent p14/p16 locus in human neoplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4990-4995.
- Marais, R., Light, Y., Paterson, H.F., and Marshall, C.J. (1995). Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation. *EMBO J* 14, 3136-3145.
- Marais, R., Light, Y., Paterson, H.F., Mason, C.S., and Marshall, C.J. (1997). Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases. *J Biol Chem* 272, 4378-4383.
- Martins, L.M., Iaccarino, I., Tenev, T., Gschmeissner, S., Totty, N.F., Lemoine, N.R., Savopoulos, J., Gray, C.W., Creasy, C.L., Dingwall, C., *et al.* (2002). The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif. *J Biol Chem* 277, 439-444.
- Mason, C.S., Springer, C.J., Cooper, R.G., Superti-Furga, G., Marshall, C.J., and Marais, R. (1999). Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. *EMBO J* 18, 2137-2148.
- Matallanas, D., Birtwistle, M., Romano, D., Zebisch, A., Rauch, J., von Kriegsheim, A., and Kolch, W. (2011). Raf family kinases: old dogs have learned new tricks. *Genes Cancer* 2, 232-260.
- McCubrey, J.A., Lahair, M.M., and Franklin, R.A. (2006). Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways. *Antioxid Redox Signal* 8, 1775-1789.
- Meier, F., Schitteck, B., Busch, S., Garbe, C., Smalley, K., Satyamoorthy, K., Li, G., and Herlyn, M. (2005). The RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling pathways present molecular targets for the effective treatment of advanced melanoma. *Front Biosci* 10, 2986-3001.
- Mertens, F., Johansson, B., Höglund, M., and Mitelman, F. (1997). Chromosomal imbalance maps of malignant solid tumors: a cytogenetic survey of 3185 neoplasms. *Cancer Res* 57, 2765-2780.

- Micalizzi, D.S., Farabaugh, S.M., and Ford, H.L. (2010). Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 15, 117-134.
- Miller, A.J., and Mihm, M.C. (2006). Melanoma. *N Engl J Med* 355, 51-65.
- Moisoi, N., Klupsch, K., Fedele, V., East, P., Sharma, S., Renton, A., Plun-Favreau, H., Edwards, R.E., Teismann, P., Esposti, M.D., *et al.* (2009). Mitochondrial dysfunction triggered by loss of HtrA2 results in the activation of a brain-specific transcriptional stress response. *Cell Death Differ* 16, 449-464.
- Montagut, C., Sharma, S.V., Shioda, T., McDermott, U., Ulman, M., Ulkus, L.E., Dias-Santagata, D., Stubbs, H., Lee, D.Y., Singh, A., *et al.* (2008). Elevated CRAF as a potential mechanism of acquired resistance to BRAF inhibition in melanoma. *Cancer Res* 68, 4853-4861.
- Mullany, S.A., Moslemi-Kebria, M., Rattan, R., Khurana, A., Clayton, A., Ota, T., Mariani, A., Podratz, K.C., Chien, J., and Shridhar, V. (2011). Expression and functional significance of HtrA1 loss in endometrial cancer. *Clin Cancer Res* 17, 427-436.
- Murwantoko, Yano, M., Ueta, Y., Murasaki, A., Kanda, H., Oka, C., and Kawaichi, M. (2004). Binding of proteins to the PDZ domain regulates proteolytic activity of HtrA1 serine protease. *Biochem J* 381, 895-904.
- Nakayama, M., Wada, M., Harada, T., Nagayama, J., Kusaba, H., Ohshima, K., Kozuru, M., Komatsu, H., Ueda, R., and Kuwano, M. (1998). Hypomethylation status of CpG sites at the promoter region and overexpression of the human MDR1 gene in acute myeloid leukemias. *Blood* 92, 4296-4307.
- Narkiewicz, J., Klasa-Mazurkiewicz, D., Zurawa-Janicka, D., Skorko-Glonek, J., Emerich, J., and Lipinska, B. (2008). Changes in mRNA and protein levels of human HtrA1, HtrA2 and HtrA3 in ovarian cancer. *Clin Biochem* 41, 561-569.
- Narkiewicz, J., Lapinska-Szumczyk, S., Zurawa-Janicka, D., Skorko-Glonek, J., Emerich, J., and Lipinska, B. (2009a). Expression of human HtrA1, HtrA2, HtrA3 and TGF-beta1 genes in primary endometrial cancer. *Oncol Rep* 21, 1529-1537.
- Narkiewicz, J., Lapinska-Szumczyk, S., Zurawa-Janicka, D., Skorko-Glonek, J., Emerich, J., and Lipinska, B. (2009b). Expression of human HtrA1, HtrA2, HtrA3 and TGF-beta 1 genes in primary endometrial cancer. *Oncology Reports* 21, 1529-1537.
- Narkiewicz, J., Klasa-Mazurkiewicz, D., Zurawa-Janicka, D., Skorko-Glonek, J., Emerich, J., and Lipinska, B. (2008). Changes in mRNA and protein levels of human HtrA1, HtrA2 and HtrA3 in ovarian cancer. *Clinical Biochemistry* 41, 561-569.
- Nazarian, R., Shi, H., Wang, Q., Kong, X., Koya, R.C., Lee, H., Chen, Z., Lee, M.K., Attar, N., Sazegar, H., *et al.* (2010). Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature* 468, 973-977.
- Newton, J.A. (1994). Genetics of melanoma. *Br Med Bull* 50, 677-687.
- Nie, G.Y., Hampton, A., Li, Y., Findlay, J.K., and Salamonsen, L.A. (2003a). Identification and cloning of two isoforms of human high-temperature requirement factor A3 (HtrA3), characterization of its genomic structure and comparison of its tissue distribution with HtrA1 and HtrA2. *Biochem J* 371, 39-48.
- Nie, G.Y., Li, Y., Minoura, H., Batten, L., Ooi, G.T., Findlay, J.K., and Salamonsen, L.A. (2003b). A novel serine protease of the mammalian HtrA family is up-regulated in mouse uterus coinciding with placentation. *Mol Hum Reprod* 9, 279-290.

- Oka, C., Tsujimoto, R., Kajikawa, M., Koshiba-Takeuchi, K., Ina, J., Yano, M., Tsuchiya, A., Ueta, Y., Soma, A., Kanda, H., *et al.* (2004). HtrA1 serine protease inhibits signaling mediated by Tgfbeta family proteins. *Development* 131, 1041-1053.
- Okano, M., Xie, S., and Li, E. (1998). Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet* 19, 219-220.
- Paraíso, K.H., Xiang, Y., Rebecca, V.W., Abel, E.V., Chen, Y.A., Munko, A.C., Wood, E., Fedorenko, I.V., Sondak, V.K., Anderson, A.R., *et al.* (2011). PTEN loss confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through the suppression of BIM expression. *Cancer Res* 71, 2750-2760.
- Parmiter, A.H., Balaban, G., Clark, W.H., and Nowell, P.C. (1988). Possible involvement of the chromosome region 10q24---q26 in early stages of melanocytic neoplasia. *Cancer Genet Cytogenet* 30, 313-317.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K., and Cobb, M.H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22, 153-183.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., and Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30, e36.
- Pfleiderer, P., Sumandea, M.P., Rybin, V.O., Wang, C., and Steinberg, S.F. (2009). Raf-1: a novel cardiac troponin T kinase. *J Muscle Res Cell Motil* 30, 67-72.
- Plun-Favreau, H., Klupsch, K., Moiso, N., Gandhi, S., Kjaer, S., Frith, D., Harvey, K., Deas, E., Harvey, R.J., McDonald, N., *et al.* (2007). The mitochondrial protease HtrA2 is regulated by Parkinson's disease-associated kinase PINK1. *Nat Cell Biol* 9, 1243-1252.
- Pollock, P.M., Harper, U.L., Hansen, K.S., Yudt, L.M., Stark, M., Robbins, C.M., Moses, T.Y., Hostetter, G., Wagner, U., Kakareka, J., *et al.* (2003). High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* 33, 19-20.
- Pollock, P.M., Walker, G.J., Glendening, J.M., Que Noy, T., Bloch, N.C., Fountain, J.W., and Hayward, N.K. (2002). PTEN inactivation is rare in melanoma tumours but occurs frequently in melanoma cell lines. *Melanoma Res* 12, 565-575.
- Poulikakos, P.I., Persaud, Y., Janakiraman, M., Kong, X., Ng, C., Moriceau, G., Shi, H., Atefi, M., Titz, B., Gabay, M.T., *et al.* (2011). RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature* 480, 387-390.
- Poulikakos, P.I., Zhang, C., Bollag, G., Shokat, K.M., and Rosen, N. (2010). RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature* 464, 427-430.
- Prestridge, D.S., and Burks, C. (1993). The density of transcriptional elements in promoter and non-promoter sequences. *Hum Mol Genet* 2, 1449-1453.
- Pulukuri, S.M., and Rao, J.S. (2006). CpG island promoter methylation and silencing of 14-3-3sigma gene expression in LNCaP and Tramp-C1 prostate cancer cell lines is associated with methyl-CpG-binding protein MBD2. *Oncogene* 25, 4559-4572.
- Raica, M., Cimpan, A.M., and Ribatti, D. (2009). Angiogenesis in pre-malignant conditions. *Eur J Cancer* 45, 1924-1934.
- Richmond, A., Fine, R., Murray, D., Lawson, D.H., and Priest, J.H. (1986). Growth factor and cytogenetic abnormalities in cultured nevi and malignant melanomas. *J Invest Dermatol* 86, 295-302.

- Robertson, G.P., Herbst, R.A., Nagane, M., Huang, H.J., and Cavenee, W.K. (1999). The chromosome 10 monosomy common in human melanomas results from loss of two separate tumor suppressor loci. *Cancer Res* 59, 3596-3601.
- Rodríguez-Paredes, M., and Esteller, M. (2011). Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nat Med* 17, 330-339.
- Runyon, S.T., Zhang, Y., Appleton, B.A., Sazinsky, S.L., Wu, P., Pan, B., Wiesmann, C., Skelton, N.J., and Sidhu, S.S. (2007). Structural and functional analysis of the PDZ domains of human HtrA1 and HtrA3. *Protein Sci* 16, 2454-2471.
- Rushworth, L.K., Hindley, A.D., O'Neill, E., and Kolch, W. (2006). Regulation and role of Raf-1/B-Raf heterodimerization. *Mol Cell Biol* 26, 2262-2272.
- Sansom, O.J., Berger, J., Bishop, S.M., Hendrich, B., Bird, A., and Clarke, A.R. (2003). Deficiency of Mbd2 suppresses intestinal tumorigenesis. *Nat Genet* 34, 145-147.
- Sato, N., Maitra, A., Fukushima, N., van Heek, N.T., Matsubayashi, H., Iacobuzio-Donahue, C.A., Rosty, C., and Goggins, M. (2003). Frequent hypomethylation of multiple genes overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Res* 63, 4158-4166.
- Satyamoorthy, K., Li, G., Guerrero, M.R., Brose, M.S., Volpe, P., Weber, B.L., Van Belle, P., Elder, D.E., and Herlyn, M. (2003). Constitutive mitogen-activated protein kinase activation in melanoma is mediated by both BRAF mutations and autocrine growth factor stimulation. *Cancer Res* 63, 756-759.
- Saxonov, S., Berg, P., and Brutlag, D.L. (2006). A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 1412-1417.
- Sherr, C.J., and McCormick, F. (2002). The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2, 103-112.
- Shridhar, V., Sen, A., Chien, J., Staub, J., Avula, R., Kovats, S., Lee, J., Lillie, J., and Smith, D.I. (2002). Identification of underexpressed genes in early- and late-stage primary ovarian tumors by suppression subtraction hybridization. *Cancer Res* 62, 262-270.
- Smalley, K.S., and Eisen, T.G. (2003). Farnesyl transferase inhibitor SCH66336 is cytostatic, pro-apoptotic and enhances chemosensitivity to cisplatin in melanoma cells. *Int J Cancer* 105, 165-175.
- Smiraglia, D.J., Rush, L.J., Frühwald, M.C., Dai, Z., Held, W.A., Costello, J.F., Lang, J.C., Eng, C., Li, B., Wright, F.A., *et al.* (2001). Excessive CpG island hypermethylation in cancer cell lines versus primary human malignancies. *Hum Mol Genet* 10, 1413-1419.
- Strauch, K.L., Johnson, K., and Beckwith, J. (1989). Characterization of degP, a gene required for proteolysis in the cell envelope and essential for growth of *Escherichia coli* at high temperature. *J Bacteriol* 171, 2689-2696.
- Strauss, K.M., Martins, L.M., Plun-Favreau, H., Marx, F.P., Kautzmann, S., Berg, D., Gasser, T., Wszolek, Z., Müller, T., Bornemann, A., *et al.* (2005). Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 14, 2099-2111.
- Strichman-Almashanu, L.Z., Lee, R.S., Onyango, P.O., Perlman, E., Flam, F., Frieman, M.B., and Feinberg, A.P. (2002). A genome-wide screen for normally methylated human CpG islands that can identify novel imprinted genes. *Genome Res* 12, 543-554.
- Studier, F.W., and Moffatt, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189, 113-130.

- Supanji, Shimomachi, M., Hasan, M.Z., Kawaichi, M., and Oka, C. (2013). HtrA1 is induced by oxidative stress and enhances cell senescence through p38 MAPK pathway. *Exp Eye Res* 112, 79-92.
- Suzuki, H., Gabrielson, E., Chen, W., Anbazhagan, R., van Engeland, M., Weijnenberg, M.P., Herman, J.G., and Baylin, S.B. (2002). A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer. *Nat Genet* 31, 141-149.
- Tocharus, J., Tsuchiya, A., Kajikawa, M., Ueta, Y., Oka, C., and Kawaichi, M. (2004). Developmentally regulated expression of mouse HtrA3 and its role as an inhibitor of TGF-beta signaling. *Dev Growth Differ* 46, 257-274.
- Torii, S., Kusakabe, M., Yamamoto, T., Maekawa, M., and Nishida, E. (2004). Sef is a spatial regulator for Ras/MAP kinase signaling. *Dev Cell* 7, 33-44.
- Tsao, H., Atkins, M.B., and Sober, A.J. (2004). Management of cutaneous melanoma. *N Engl J Med* 351, 998-1012.
- Tucker, M.A., and Goldstein, A.M. (2003). Melanoma etiology: where are we? *Oncogene* 22, 3042-3052.
- Tzivion, G., and Avruch, J. (2002). 14-3-3 proteins: active cofactors in cellular regulation by serine/threonine phosphorylation. *J Biol Chem* 277, 3061-3064.
- Vande Walle, L., Lamkanfi, M., and Vandenabeele, P. (2008). The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: an overview. *Cell Death Differ* 15, 453-460.
- Vigil, D., Cherfils, J., Rossman, K.L., and Der, C.J. (2010). Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? *Nat Rev Cancer* 10, 842-857.
- Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1993). The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 9, 138-141.
- Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10, 789-799.
- Wade, P.A., and Wolffe, A.P. (2001). ReCoGnizing methylated DNA. *Nat Struct Biol* 8, 575-577.
- Wagle, N., Emery, C., Berger, M.F., Davis, M.J., Sawyer, A., Pochanard, P., Kehoe, S.M., Johannessen, C.M., Macconail, L.E., Hahn, W.C., *et al.* (2011). Dissecting therapeutic resistance to RAF inhibition in melanoma by tumor genomic profiling. *J Clin Oncol* 29, 3085-3096.
- Wan, P.T., Garnett, M.J., Roe, S.M., Lee, S., Niculescu-Duvaz, D., Good, V.M., Jones, C.M., Marshall, C.J., Springer, C.J., Barford, D., *et al.* (2004). Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 116, 855-867.
- Wang, N., Eckert, K.A., Zomorodi, A.R., Xin, P., Pan, W., Shearer, D.A., Weisz, J., Maranus, C.D., and Clawson, G.A. (2012). Down-regulation of HtrA1 activates the epithelial-mesenchymal transition and ATM DNA damage response pathways. *PLoS One* 7, e39446.
- Wang, S., Ghosh, R.N., and Chellappan, S.P. (1998). Raf-1 physically interacts with Rb and regulates its function: a link between mitogenic signaling and cell cycle regulation. *Mol Cell Biol* 18, 7487-7498.
- Weber, C.K., Slusky, J.R., Herrmann, C., Schuler, M., Rapp, U.R., and Block, C. (2000). Mitogenic signaling of Ras is regulated by differential interaction with Raf isozymes. *Oncogene* 19, 169-176.

- Wellbrock, C., Karasarides, M., and Marais, R. (2004). The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 875-885.
- Whitwam, T., Vanbrocklin, M.W., Russo, M.E., Haak, P.T., Bilgili, D., Resau, J.H., Koo, H.M., and Holmen, S.L. (2007). Differential oncogenic potential of activated RAS isoforms in melanocytes. *Oncogene* 26, 4563-4570.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B., and Johnson, G.L. (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 79, 143-180.
- Willmore-Payne, C., Holden, J.A., Tripp, S., and Layfield, L.J. (2005). Human malignant melanoma: detection of BRAF- and c-kit-activating mutations by high-resolution amplicon melting analysis. *Hum Pathol* 36, 486-493.
- Witsch, E., Sela, M., and Yarden, Y. (2010). Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology (Bethesda)* 25, 85-101.
- Wolf, S.F., Jolly, D.J., Lunnen, K.D., Friedmann, T., and Migeon, B.R. (1984). Methylation of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase locus on the human X chromosome: implications for X-chromosome inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 2806-2810.
- Worm, J., Christensen, C., Grønbaek, K., Tulchinsky, E., and Guldberg, P. (2004). Genetic and epigenetic alterations of the APC gene in malignant melanoma. *Oncogene* 23, 5215-5226.
- Xing, F., Persaud, Y., Pratilas, C.A., Taylor, B.S., Janakiraman, M., She, Q.B., Gallardo, H., Liu, C., Merghoub, T., Hefter, B., *et al.* (2012). Concurrent loss of the PTEN and RB1 tumor suppressors attenuates RAF dependence in melanomas harboring (V600E)BRAF. *Oncogene* 31, 446-457.
- Yachida, S., Jones, S., Bozic, I., Antal, T., Leary, R., Fu, B., Kamiyama, M., Hruban, R.H., Eshleman, J.R., Nowak, M.A., *et al.* (2010). Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature* 467, 1114-1117.
- Yang, J., and Weinberg, R.A. (2008). Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell* 14, 818-829.
- Yang, Z., Camp, N.J., Sun, H., Tong, Z., Gibbs, D., Cameron, D.J., Chen, H., Zhao, Y., Pearson, E., Li, X., *et al.* (2006). A variant of the HTRA1 gene increases susceptibility to age-related macular degeneration. *Science* 314, 992-993.
- Zentner, G.E., and Henikoff, S. (2013). Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nat Struct Mol Biol* 20, 259-266.
- Zhang, B.H., and Guan, K.L. (2000). Activation of B-Raf kinase requires phosphorylation of the conserved residues Thr598 and Ser601. *EMBO J* 19, 5429-5439.
- Zhang, Y., Ng, H.H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Bird, A., and Reinberg, D. (1999). Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes & Development* 13, 1924-1935.
- Zhu, D., Hunter, S.B., Vertino, P.M., and Van Meir, E.G. (2011). Overexpression of MBD2 in glioblastoma maintains epigenetic silencing and inhibits the antiangiogenic function of the tumor suppressor gene BAI1. *Cancer Res* 71, 5859-5870.
- Zhu, F., Jin, L., Luo, T.P., Luo, G.H., Tan, Y., and Qin, X.H. (2010). Serine protease HtrA1 expression in human hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International* 9, 508-512.

Zumbrunn, J., and Trueb, B. (1996). Primary structure of a putative serine protease specific for IGF-binding proteins. *FEBS Lett* 398, 187-192.

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist aufgrund von Datenschutzgründen in dieser veröffentlichten Version nicht abgebildet.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den _____

Unterschrift des Doktoranden

Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Untersuchungen zur Regulation und Bedeutung der Serinprotease HTRA1 in Tumorzellen“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Kamilla Ripkens befürworte.

Essen, den _____

Unterschrift eines Mitglieds der Universität Duisburg-Essen

Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner andern Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den _____

Unterschrift des Doktoranden